Der agglutinierende, antifungale Faktor aus den Knollen von *Cyperus esculentus*: Optimierung der Reinigung und weitere Untersuchungen zur Hemmung des Wachstums phytopathogener Pilze.

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Corina Böck
aus Tauberbischofsheim

Würzburg 2002

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Bisherige Veröffentlichungen:

Rüdiger H., Torres-Londono P., Heid-Jehn C. and Böck C.
"Chitin- and chitosan-binding factors from plants".
European Journal of Cell Biology, Supplement 46, (Vol. 74),
INTERLEC 1997, Würzburg

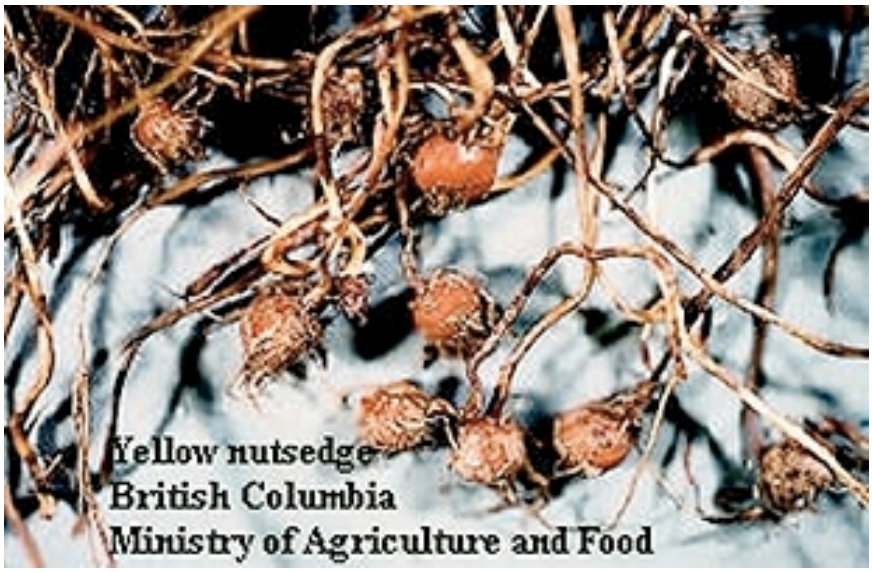
Böck C., Heid-Jehn C. and Rüdiger H.
"A high-molecular carbohydrate-binding and fungicide factor of plant origin".
Archiv der Pharmazie, Supplement 2, (Vol. 331), 1998
Poster, DPhG Jahrestagung 1998, Tübingen

Böck C., Heid-Jehn C.,Rüdiger H., Bertemann R., Schmid T., Tacke R.
"A high-molecular carbohydrate-binding and antifungal factor from the sedge *Cyperus esculentus*".
Vortrag, INTERLEC 18, 1999, Portsmouth

Böck C., Heid-Jehn C. and Rüdiger H.
"A hemagglutinating carbohydrate-binding and fungicide factor from the sedge *Cyperus esculentus*".
European Journal of Cell Biology, Supplement 50, (Vol. 79), 2000
Poster, 24 th Annual Meeting of the German Society of Cell Biology, 2000, Karlsruhe

Für meine Eltern

Cyperus esculentus Knöllchen:



Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

I.1 Lectine allgemein 1

I.2 Vorkommen von Lectinen 2

I.3 Toxizität 2

I.4 Biologische Funktionen der Lectine 3

I.5 Medizinisch / Pharmakologische Bedeutung der Lectine 4

I.6 Pilze (Fungi = Mycota) 6

I.6.1 Allgemeine Charakteristika von Pilzen 6

I.6.2 Die Phasen der Besiedelung 7

I.6.3 Oberflächensignale 8

I.6.4 Das Eindringen in die Pflanze 9

II. Aufgabenstellung und Kenntnisstand 10

III. Allgemeiner Teil 11

III.1 Isolierung und Charakterisierung des Faktors aus *Cyperus esculentus* 11

III.1.1 Herstellung des Rohextraktes 11

III.1.2 Untersuchung auf agglutinierende Aktivität 11

III.1.2.1 Titer in Abhängigkeit vom pH-Wert des Extraktionsmediums 11

III.1.2.2 Titer in Abhängigkeit von der Ionenstärke im Extraktionspuffer 13

III.1.3 Bestimmung der Zuckerbindungsspezifität 13

III.1.4 Untersuchung der Agglutinationskraft verschiedener Ionen 14

III.1.4.1 Testreihe mit Ammoniumsulfat 14

III.1.4.2 Testreihe mit Natriumchlorid 15

III.1.4.3 Testreihe mit Calciumacetat 15

III.1.4.4 Testreihe mit Magnesiumchlorid 15

III.2 Isolierung und erste Reinigung 16

III.2.1 Fällung mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung 16

III.2.2 Fällung mit festem Ammoniumsulfat 17

III.2.3 Fällung mit Aceton unter Eiskühlung 18

III.2.4 Fällung mit Ethanol unter Eiskühlung 19

III.2.5 Reinigung durch pH-Fällung 19

III.3 Isolierung und Optimierung der Reinigung 21

III.3.1 Reinigung mittels Gelfiltration 21
III.3.1.1 Gelfiltration an Sephadex G-25 21
III.3.1.2 Gelfiltration an Sephadex G-10 23
III.3.2 Reinigung mittels Affinitätschromatographie 25
III.3.2.1 Affinitätschromatographie an Chitosan 25
III.3.3 Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie 26
III.3.3.1 Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose (Whatman CM-52) 27
III.3.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose High Performance 27
III.3.4.1 Vorversuche zur Bindung der agglutinierenden Aktivität 28
III.3.4.2 Optimierung der Versuchsbedingungen für die Durchführung der HIC 31
III.3.4.2.1 HIC an Phenyl Sepharose HP, NaCl als Startpuffersubstanz 31
III.3.4.2.2 HIC an Phenyl Sepharose HP, $(NH_4)_2SO_4$ als Startpuffersubstanz 32
III.3.4.3 Übertragung der optimierten Versuchsbedingungen auf einen größeren Maßstab 38
III.3.4.4 Vergrößerung des Säulenmaßstabs 43
III.3.4.5 Elution unter Anwendung eines Stufengradienten 43
III.4 Methoden zur Reinheitsprüfung 45
III.4.1 Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen (native Elektrophorese) 45
Vorversuche zur Anfärbung 46
Elektrophorese 46
Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) 47
III.4.2 Kapillarelektrophorese 48
Probenaufgabe 49
Detektion 49
III.4.3 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) 53
Chromatographie an unpolaren stationären Phasen (Reversed Phase Chromatography RPC) 53
IV. Charakterisierung des chitosanbindenden Faktors aus *Cyperus esculentus* 55
IV.1 Agglutinationsaktivität 55
IV.2 Zuckerbindungsspezifität und minimale Hemmkonzentrationen 56
IV.3 Proteinbestimmung über UV-Absorption 56
IV.4 Aminosäurebestimmung 56

IV.5 Uronsäurenbestimmung 57
IV.5.1 Quantitative Bestimmung der Uronsäuren mit Hilfe eines Microtiterplatten-Tests 57
IV.6 Neutralzuckergehalt 58
IV.6.1 Quantitative Bestimmung des Neutralzuckergehaltes nach Dubois *et al.* 58
IV.7 Siliciumbestimmung 59
IV.7.1 Bestimmung des Aschegehaltes (Glührückstandes durch direkte Veraschung) 59
IV.7.2 Gravimetrische Silikatbestimmung 60
IV.7.3 Silicium-Bestimmung mittels ^{29}Si CP MAS NMR-Spektroskopie 61
IV.8 Molekulargewichtsbestimmung 63
IV.9 UV-Absorptionsspektrum 66
V. Biologische Aktivität des *Cyperus-esculentus*-Faktors gegen pathogenen Pilzbefall 67
V.1 Bestimmung der antifungalen Wirkung des *Cyperus-esculentus*-Faktors gegen *Fusarium moniliformis* 68
V.2 Bestimmung der antifungalen Aktivität des *Cyperus-esculentus*-Faktors gegen *Fusarium solani f. pisi* 70
V.3 Bestimmung der antifungalen Aktivität des *Cyperus-esculentus*-Faktors gegen *Fusarium culmorum* 71
V.4 Test der hemmenden Wirkung auf *Candida albicans* 72
VI. Diskussion 74
VII. Zusammenfassung 78
VIII. Summary 80
IX. Danksagung 82
X. Ausblick 83
Untersuchung von *Cyperus alternifolius* (Zypergras) auf Agglutinationsaktivität 83
XI. Experimentalteil 84
XI.1 Material 84
XI.1.1 Pflanzenmaterial 84
XI.1.2 Material 84
XI.1.3 Pilzkulturen 84
XI.1.4 Reagenzien 84
XI.1.5 Verbrauchsmaterial 85
XI.1.6 Geräte 86
XI.2 Methoden 87

XI.2.1 Rohextraktherstellung 87
XI.2.2 Bestimmung der Agglutinationsaktivität mittels Hämagglutinationsassay 87
XI.2.3 Bestimmung der Zuckerbindungsspezifität 88
XI.2.4 Vorreinigung mittels Ammoniumsulfatfällung 89
XI.2.5 Fällung mit organischen Lösungsmitteln 90
XI.2.6 Reinigung durch pH-Fällung 90
XI.2.7 Reinigung mittels Gelfiltration an Sephadex G-25 bzw. G-10 91
XI.2.8 Affinitätschromatographie an Chitosan 91
XI.2.9 Ionenaustauschchromatographie 91
XI.2.10 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) 92
Ermittlung der Bindungskapazität der Phenyl Sepharose HP (batch-Verfahren) 92
Hydrophobe Interaktionschromatographie 93
XI.2.11 Methoden der Proteinbestimmung 93
XI.2.12 Vorversuche zur Anfärbbarkeit des *Cyperus-esculentus*-Faktors 94
XI.2.13 Celluloseacetatmembran-Elektrophorese 95
XI.2.14 Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) 97
XI.2.15 Hochleistungs-Flüssigchromatographie 100
XI.2.16 Aminosäurebestimmung nach saurer Hydrolyse 100
XI.2.17 Uronsäuren-Bestimmung 101
XI.2.18 Quantitative Bestimmung des Neutralzuckergehaltes nach Dubois *et al.* 101
XI.2.19 Bestimmung des Aschegehaltes (Glührückstandes durch direkte Veraschung) 102
XI.2.20 Gravimetrische Silikatbestimmung 102
XI.2.21 Molmassenbestimmung 102
XI.2.22 Bestimmung der antifungalen Aktivität des *Cyperus esculentus*-Faktors 103
Pilzkulturen 103
Anzucht der Pilzkulturen 104
Herstellung des Kartoffelinfus 105
Herstellung der Nährlösung 105
Impfung 105
Herstellung der Testsporensuspension 106
Versuchsdurchführung 106
Auswertung 107
XII. Literatur 108

I. Einleitung

I.1 Lectine allgemein

Bei Lectinen handelt es sich um Proteine, die die Eigenschaft besitzen, mit Monosacchariden und Oligosacchariden sowie auch mit Zuckerstrukturen von Glycoproteinen und Glycolipiden nichtkovalente Bindungen einzugehen. Die Entdeckung Stillmarks im Jahre 1888 in Dorpat (Estland), daß wässrige Extrakte mancher Pflanzen befähigt sind, an die Oberfläche der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) zu binden, weckte das Interesse zur Erforschung dieser Substanzen. In den folgenden Jahrzehnten wurde die gleiche Eigenschaft für viele andere Samenextrakte beschrieben und einzelnen Proteinen zugeordnet[1,2]. Die Bezeichnung „Lectin“ leitet sich vom lateinischen „legere“ (auswählen) ab und soll die Fähigkeit einiger Lectine kennzeichnen, komplexe Glycolipidstrukturen an der Membranoberfläche von humanen Erythrozyten zu binden und zwischen den Blutgruppen des menschlichen AB0(H)-Systems zu unterscheiden[3]. Der Großteil dieser Substanzklasse reagiert allerdings wenig wählerisch auf die Erythrozyten menschlichen oder tierischen Ursprungs und kann lediglich zwischen einfachen Zuckern wie Glucose/ Mannose, Galactose, L-Fucose, N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin unterscheiden[4]. Die sichtbare Reaktion beschränkt sich hierbei auf ein Zusammenklumpen (Agglutination) der roten Blutkörperchen, was in ihren wesentlich älteren auch heute noch verwendeten Namen „Agglutinin“, „Hämagglutinin“ zum Ausdruck kommt. Pflanzliche Lectine bezeichnet man auch als „Phytohämagglutinine“.

Goldstein *et al.*[5] zogen die Agglutinationseigenschaft zur Abgrenzung und Definition des Begriffs Lectin von anderen Proteinen mit ähnlichen Eigenschaften heran, wonach Lectine Proteine oder Glycoproteine nichtimmunogenen Ursprungs und konstitutiv vorhanden sind, keine enzymatische Aktivität aufweisen, sowie mindestens zwei mehr oder weniger spezifische Zuckerbindungsstellen besitzen müssen, um mit ihren jeweiligen Reaktionspartnern, die ebenfalls mehr als eine Kohlenhydratstruktur tragen müssen, Netzwerke auszubilden, die dann als Agglutinate erkannt werden können. Diese Präzipitationsreaktion bewirkt jedoch keine Modifikation an den Zuckerstrukturen. Diese Eigenschaften grenzen die Lectine gegenüber anderen Substanzen wie den ebenfalls zur Agglutination befähigten Gerbstoffen oder den Enzymen durch das Ausbleiben einer chemischen Veränderung der gebundenen Zucker ab. Die Zuckerspezifität eines Lectins wird normalerweise durch einfache Zuckerstrukturen wie Monosaccharide beschrieben, die in der Lage sind, die Agglutination durch kompetitive Hemmung zu verhindern. Zuckerspezifische Enzyme

wie Glycosidasen, Glycosyltransferasen, Glycosylkinasen, Transportproteine usw. sind nach dieser Definition keine Lectine. Allerdings gelten nach der erweiterten Definition von 1981[6] auch Proteine mit nur einer Bindungsstelle wie das Ricin aus *Ricinus communis* und das Abrin aus der indischen Paternostererbse (*Abrus precatorius*) als Lectine, da die Fähigkeit zur Zuckerbindung physiologisch von Bedeutung ist und nicht die Eigenschaft, zur Agglutination befähigt zu sein.
Natürlich unterliegt die Definition der Lectine stetiger Erweiterung durch jüngste Forschungsergebnisse. So werden heute auch Lectine beschrieben, die neben den bekannten Eigenschaften auch eine enzymatische Aktivität aufweisen[7].

I.2 Vorkommen von Lectinen

Lectine kommen ubiquitär in allen Organisationsformen vor[4]. Die meisten der bekannten Lectine stammen aus dem Pflanzenreich, wo sie in den Speicherorganen lokalisiert sind, wie beispielsweise in den Samen, Früchten, Wurzeln, Knollen und in gleicher Weise auch in der Rinde sowie im Holz von Bäumen und Sträuchern. Subzellulär findet man die meisten Lectine in den Proteinkörpern, d.h. Speicherorganellen, die sich von der Vakuole ableiten. Mit über 70 bekannten Lectinen liegt die Familie der Leguminosen („Schmetterlingsblütler“) deutlich vor den Gramineen und Solanaceen[8]. Die Forschung beschränkte sich aber nicht nur auf das Pflanzenreich. So konnten Lectine auch in Pilzen[9] und Bakterien[10] wie *Escherichia coli, Actinomyces* und Mycoplasmen nachgewiesen werden. In wirbellosen Tieren, wie bei der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*), dem Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*) und dem Hummer (*Homarus americanus*)[11] wurden ebenfalls Lectine entdeckt.
Nicht zuletzt wurden sie auch in Wirbeltieren, wie beispielsweise der Leber von Ratten, Kaninchen und Hühnern[12] und beim Menschen[13] gefunden.

I.3 Toxizität

Je nach Art des Lectins können schädliche oder nützliche Einflüsse beobachtet werden. Einige Lectine sind sehr toxisch für höhere Organismen wie etwa das Ricin aus *Ricinus communis*. Ricin leitete die Lectinforschung ein und rückte 1978 bei dem legendären „Regenschirm-Mord“ an Georgi Markow, einem exil-bulgarischen Mitarbeiter von BBC London, in das kriminologische Interesse der Gerichtsmediziner. Ähnliche Wirkung besitzen die Lectine aus der indischen Paternostererbse (*Abrus precatorius*)[14], der afrikanischen Passifloraceae *Adenia digitata* und aus der europäischen Mistel (*Viscum album*)[15].

I.4 Biologische Funktionen der Lectine

Obwohl über die Struktur von Leguminosenlectinen sehr viel bekannt ist, weiß man doch sehr wenig über ihre physiologische Rolle für die Pflanzen. Die Vorschläge reichen von der Vorstellung einer speziellen Klasse von Speicherproteinen, fungistatischen bzw. bakteriostatischen Wirkungen, bis hin zur Beteiligung an der Symbiose zwischen Leguminosen und deren stickstoffbindenden gram-negativen Bodenbakterien, den Rhizobien, sowie der Verwendung als Packhilfsmittel in der Entstehung der Proteinkörper während der Samenbildung, da die isolierten Membranen der Proteinkörper zur Bindung des jeweiligen typischen Lectins befähigt sind[16].

Als Erklärung für die Funktion der Lectine als Speicherproteine geht man davon aus, daß die Samenlectine der Pflanze während der Keimung als Aminosäure- und Stickstoffpool dienen. Für diese Theorie spricht, daß die Samenlectine in den gleichen Organellen wie die übrigen Speicherproteine, den Proteinkörpern, vorkommen und während der Keimung nahezu vollständig metabolisiert werden[17,18]. Ebenso treten sie mit den Glycosidasen[19] und Phosphatasen[20] in Wechselwirkung.

Für die Theorie der Beteiligung der Lectine an der Symbiose zwischen Leguminosen und den Rhizobien spricht, daß das in den Wurzeln vorkommende Lectin der Erbse während der Keimung neu gebildet wird und auf die Oberfläche der Wurzelhaare sezerniert wird. Die Struktur dieses abgesonderten Lectins und die des Samenlectins sind identisch[21,22].

In einem weiteren Versuch wurde das Erbsenlectingen in die Wurzelzellen des weißen Klees (*Trifolium repens*) überführt. Nach der Übertragung dieses Gens in die Wurzelzellen des Klees wird von diesen das Erbsenlectin synthetisiert, und ihnen, neben der Symbiose mit den eigenen Rhizobien, die Symbiose mit dem erbsenspezifischen Rhizobium ermöglicht[21,23-25].

Eine weitere wichtige Rolle der Lectine liegt in der Abwehr von pathogenen Pilzen, Bakterien und Insekten, sowie als Fraßschutz[26].

Seit einiger Zeit sind Interaktionen zwischen Lectinen und Kohlenhydraten bei Pilzinfektionen bekannt[27]. Das Glucosaminpolymer Chitosan spielt beispielsweise im Erbsen-*Fusarium* System eine kausale Rolle bei der Wurzelfäule. Wie zahlreiche Studien belegen, besitzen die aus den Pilzzellwänden freigesetzten Chitosanoligomeren elicitorische Wirkung auf Erbsenkeimlinge.

Die Arbeiten von Claudia Heid-Jehn[28] zeigten, daß die isolierte agglutinierende Aktivität aus Knollen von *Cyperus esculentus* eine antimykotische Wirkung auf verschiedene Phytopathogene aufweist. Es schien, daß diese antifungale Aktivität möglicherweise durch zwei Komponenten, einen Protein- und einen Silikatanteil, hervorgerufen wird. Dies war für uns ein sehr interessanter

Punkt, die weitere Untersuchung und Charakterisierung des chitosanbindenden Faktors aus *Cyperus esculentus* weiter zu verfolgen.

I.5 Medizinisch / Pharmakologische Bedeutung der Lectine

Die Glycobiologie hat in den letzten Jahren einen enormen Aufschwung erfahren. Der Fortschritt der letzten beiden Forschungsdekaden verdeutlicht die tragende Rolle der Protein (Lectin)-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen im Hinblick auf Regulationsprozesse wie Zellwachstum und Apoptose, die Faltung und Ausrichtung der Glycoproteine sowie die Zelladhäsion. Gerade die letzten Jahren haben gezeigt, daß neben dem genetischen Code der Desoxyribonucleinsäure (DNA) und der Aminosäurensequenz von Proteinen noch eine weitere Gruppe von Biopolymeren - die Kohlenhydrate - existiert, die Informationen tragen können. Die komplexen Kohlenhydrate (Zuckercode) als Informationsträger bieten eine enorme Variabilität an Isomeren, die auf der Ebene des zellulären Informationstransfers ein riesiges Arsenal an Codeworten zur Zell-Zell-Kommunikation zur Verfügung stellen[29]. Empfänger dieser Signale der Kohlenhydrate sind die Rezeptoren, die per definitionem Lectine sind[14]. Die Erweiterung der beiden „biologischen Alphabete“, bestehend aus den vier Nukleotiden und den einundzwanzig proteinogenen Aminosäuren, durch ein drittes Code-System, den sog. Zuckercode[30,31] ist daher für die Komplettierung des Feldes der Glycowissenschaften unerläßlich. Die Entschlüsselung des Zuckercodes auf der Basis der Zuckersequenzen erwies sich als neue Perspektive der Lectinologie, da auf molekularer Ebene spezifische Bindungsproteine, zu denen die Lectine gehören, als Rezeptoren für Zuckerliganden fungieren[32]. Für die pharmazeutische Forschung besonders interessant sind naturgemäß die menschlichen Proteine dieser Klasse.

Nachdem sich Erythrozyten für die Erforschung pflanzlicher Lectine etablierten, machte man sich in den vergangenen Dekaden zunehmend die Fähigkeit der Lectine, selbst als Marker zur Studie verschiedener Krankheiten zu fungieren, zunutze.

Die mit Gold, Radioaktivität oder Fluoreszenz markierten Lectine stellen somit wertvolle diagnostische Hilfsmittel dar, womit sich nicht nur Makrophagen und Antikörper, sondern auch Krankheitserreger wie Viren nachweisen lassen.

Bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts wurde beobachtet, daß einige *E. coli* Stämme humane und/oder tierische Erythrozyten agglutinieren. Diese Agglutination durch Mannose und einige Mannose-Derivate spezifisch gehemmt werden. Weiterführende Untersuchungen führten zur Erkenntnis, daß die Mannose-sensitive Agglutination der Erythrozyten mit der Expression von Fimbrien der Bakterienzellen in Zusammenhang steht. Desweiteren fanden sie heraus, daß die Fimbrien der

E. coli an Intestinalzellen binden. Diese Hypothesen wurden von Van Driessche[33] und Lintermans *et al.*[34] bestätigt und erweitert.

Heute nutzt man den Einsatz anderer Zelltypen oder etablierter Zelllinien als Testsysteme. Damit ist die Möglichkeit eröffnet, dieses Modell auch für die Analyse der Lectinaktivität von Gewebeextrakten aus Säugetierorganen zu nutzen[35]. Neben der Auffindbarkeit eines Zuckerliganden in einem bestimmten Gewebe können somit auch Rückschlüsse auf die Funktion der zuckerbindenden Fraktion in der Zellerkennung und Biokommunikation (Zellphysiologie) getroffen werden[14] wie beispielsweise in der Tumorlectinologie.

Das S-Typ Lectin Galectin-3 kommt in zahlreichen menschlichen und murinen Tumorzellen vor. In stark metastasierenden Zellen wird mehr Galectin-3 an der Zelloberfläche exprimiert, was zu einer homotypischen Aggregation von Tumorzellen in der Zirkulation führt und eine wichtige Rolle im Metastasierungsprozess übernimmt, was in Überexpressionsstudien[36], sowie Anti-Galectin-3 Antikörper Studien beobachtet werden konnte[37].

Die Galectine-1 und -3 sind sehr häufig in humanen Karzinomen überexprimiert vorhanden. Von einer Überexpression des Galectin-1 wird hauptsächlich in Kolon- und Schilddrüsen-Karzinomen berichtet[38,39].

Der Interferon-Antagonist und Wachstumsregulator Sarcolectin ruft die Agglutination transfizierter Zellen (Fibroblasten) durch eine Sialinsäure-abhängige spezifische Bindung an zelluläre Oberflächenstrukturen hervor[40,41].

Die Entdeckung der Selektine als Vermittler der Bindung von Leukozyten an das aktivierte Endothel bei Entzündungsprozessen ist einem Antigen-Antikörper-Testsystem zu verdanken. Bei diesem Verfahren wird eine Palette monoklonaler Antikörper gegen Zellen konstruiert, die ihrerseits als Antigen dienen. Ist die Antigen-Antikörper-Reaktion im angewandten Testsystem mit einer Hemmung der zu messenden Aktivität verbunden, liegt die Vermutung nahe, daß das betreffende Antigen an diesem Prozess beteiligt sein könnte.

Ein aus diesem System stammender Antikörper kann wiederum zur Analyse auf das Vorhandensein eines Proteins und dessen Gensequenzierung in molekularbiologischen Expressionssystemen nützlich sein[42-44].

Der Abhängigkeit der Verweildauer von Glycosubstanzen im Blut von der Affinität ihrer Galactoseeinheiten führte zur Isolierung der Endozytose-vermittelnden Lectine (Asialoglycoproteinrezeptor) aus der Leber[45]. Sie stellen eine weitere Klasse von Gewebelectinen dar, die über den Weg der Funktion hin zum Molekül gefunden wurden. Zu den zeitlich folgenden Entdeckungen

zählen Lectine mit Spezifität für Galactose/N-Acetylgalactosamin, Mannose, Fucose und Mannose-6-phosphat in unterschiedlichen Zelltypen[46].

Der Einsatz „chemischer Detektive“ auf der Spur nach zuckerbindenden Lectinen ist ein modernes Hilfsmittel in der heutigen Lectinologie geworden[14]. Die Konjugation gebräuchlicher Kohlenhydrat-Epitope mit Proteinen oder kompatiblen nicht-immunologisch wirksamen Polymeren führt zu den Neoglycokonjugaten mit möglicherweise adaptiven Eigenschaften. Diese synthetisch hergestellten Neoglycokonjugate haben bereits als Träger von Histoblutgruppen-Trisacchariden praktische Anwendung in der Histopathologie gefunden[47,48] und erfreuen sich auf dem Forschungsgebiet der Lectine einer weiten Verbreitung[14,32,49,50].

Eine mögliche Forschungsrichtung der pharmazeutischen Industrie könnte sein, Lectine als Rezeptoren des sog. „lectin-mediated drug targeting“ therapeutisch nutzbar zu machen, da sie Zielorte für Wirkstoff beladene Zuckerstrukturen sein könnten[48,51,52]. Dies würde unerwünschte Wirkungen sowie Nebenwirkungen reduzieren, da das Zielmolekül eindeutig festgelegt ist.

I.6 Pilze (Fungi = Mycota)

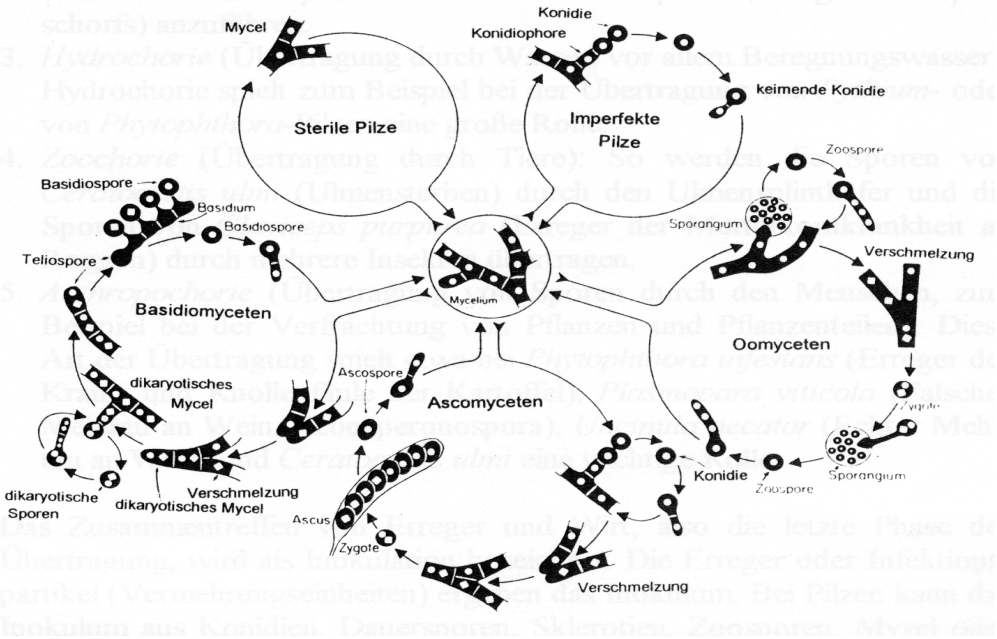
I.6.1 Allgemeine Charakteristika von Pilzen

Pilze sind heterotroph lebende, vielzellige Eukaryoten, die mit den Pflanzen den Besitz einer Zellwand, zellsaftgefüllte Vakuolen und eine mikroskopisch gut sichtbare Plasmaströmung sowie weitgehend Bewegungsunfähigkeit gemeinsam haben. Daher wurden sie früher zum Pflanzenreich gezählt. Allen Pilzen fehlen aber Plastiden. Mit Ausnahme der zur Gärung befähigten Hefen wachsen Pilze unter aeroben Bedingungen und gewinnen Energie durch Oxidation organischer Substanzen. Pilze weisen einen nur sehr geringen Grad von morphologischer Differenzierung und nahezu keine Arbeitsteilung auf. Das sehr heterogene Pilzreich umfaßt schätzungsweise 150000 Pilzarten.

Hefen sind unizelluläre Organismen. Die Zellen sind ca. 3 - 5 µm im Durchmesser und gleichen trotz ihrer geringen Größe in der Komplexität ihres Aufbaus den Pflanzen- und Tierzellen. Sie besitzen unter anderem Chromosomen, eine definierte Kernmembran, Mitochondrien und ein endoplasmatisches Reticulum. Den Saccharomycetaceae oder eigentlichen Hefen fehlt ein Mycel. Ihre Vermehrung erfolgt durch Sprossung oder Ascusbildung. Als noch stärker reduzierte Hefen sind die asporogenen Hefen (*Candida*, *Torulopsis, Cryptococcus, Rhodotorula, Pullularia* u.a.) anzusehen. Nur einige Formen bilden Mycelverbände, die meisten vermehren sich durch Zellteilung.

Charakteristisch für die meisten der Pilze sind die Hyphen (Vegetationsorgane), welche sich durch komplexe Verzweigungsmuster zum Mycel ausdifferenzieren. Die Pilzzellwände sind aus Chitin (mit N-Acetylglucosamin als monomeren Bausteinen), Cellulose (bei den Oomyceten) und Mannan (Mannose als β-1,4- oder β-1,6-verknüpfte Monomere) aufgebaut. Zur vegetativen Vermehrung werden verschiedenste Sporentypen entwickelt, die sexuelle Fortpflanzung zeigt ebenfalls eine enorme Variationsbreite (Abb. 1). Die *Fungi imperfecti* oder *Deuteromyceten* umfaßt zahlreiche Pflanzenparasiten, die keine Sexualzyklen aufweisen. Ihre Nebenfruchtform (Konidienbildung) wird auch als imperfektes (unvollkommenes) Stadium bezeichnet.

Abb. 1: Generalisiertes Schema der Lebenszyklen der Hauptgruppen pflanzenpathogener Pilze



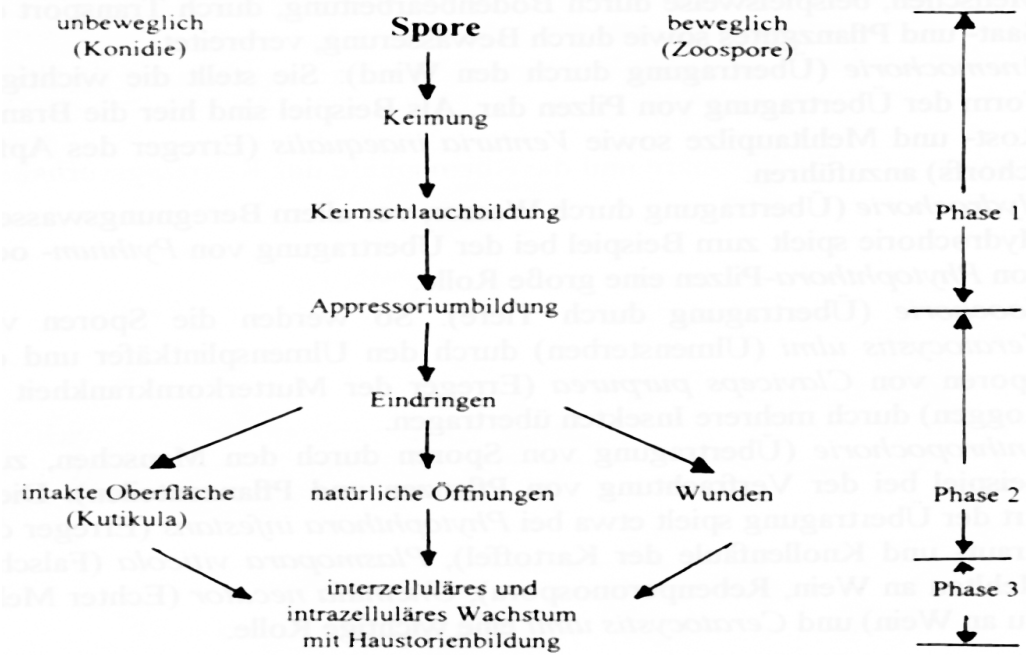
(Modifiziert nach: Agrios, G. N. (1988) *Plant Pathology.* 3. Aufl., Academic Press, San Diego.)

Zu den wichtigsten Pflanzenschädlingen zählen Vertreter der Niederen Pilze, wie Myxomycota oder Eumycota, als auch der Höheren Pilze, wozu zum Beispiel die Ascomycotina und zahlreiche Deuteromycotina (*Fungi imperfecti*) zählen[53].

I.6.2 Die Phasen der Besiedelung

Die eigentliche Besiedlung der Wirtspflanze durch das Pathogen kann in mehrere Abschnitte untergliedert werden.

Abb. 2: Infektionswege bei Pilzbefall



Phase 1: Anheftung der Spore an die Pflanzenoberfläche, Sporenkeimung und Bildung des Keimschlauches;
Phase 2: Ausbildung des Appressoriums und Eindringen mit Hilfe der Penetrationshyphe;
Phase 3: Ausdifferenzierung der Infektionshyphe; intra- und interzelluläres Wachstum mit Haustorienbildung.
(Modifiziert nach Hoffmann, G. M. *et al.* (1994). In: Lehrbuch der Phytomedizin. 3. Aufl., Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin).

I.6.3 Oberflächensignale

Sowohl bei der Sporenkeimung als auch bei der Ausdifferenzierung von Appressorien spielen oft Signale auf der Pflanzenoberfläche eine wichtige Rolle[54].

In Untersuchungen zur Bedeutung von Oberflächenstrukturen führte die Simulation des Vorhandenseins von Spaltöffnungen zur Bildung und Ausdifferenzierung von Appressorien. Es handelt sich hierbei um einen thigmotropischen Reiz, das heißt, es wird durch Berührungssignale eine gerichtete Bewegung ausgelöst.

Am Beispiel *Colletotrichum gloeasporioides*, dem Erreger der Brennfleckkrankheit an Avocado konnte gezeigt werden, daß sowohl die Sporenkeimung als auch die Appressorienbildung dieses Pilzes spezifisch durch Wachse an der Oberfläche der Avocadofrucht induziert wurden. Als aktivste Komponente des Avocadowachses zeigten sich langkettige Alkohole mit 24 oder mehr C-Atomen[55].

Viele Pilze infizieren eine Frucht erst dann, wenn sie reif ist. Die Bedeutung von Ethylen - dem

„Reifungshormon“ vieler Pflanzen - als Infektionssignal für Pilze wurde näher untersucht und erwies sich bei *Colletotrichum*-Arten, die klimakterische Früchte bilden (Früchte, die während ihrer Reifung eine erhöhte Atmungsaktivität und eine vermehrte Ethylenbildung aufweisen), als Signal für die Ausdifferenzierung von Infektionsstrukturen.

I.6.4 Das Eindringen in die Pflanze

Pilze können sich entweder über natürliche Öffnungen, wie Stomata, Lenticellen und Hydathoden, sowie durch Wunden oder über intakte Oberflächen (Kutikula und Zellwand) Zugang zur Wirtspflanze verschaffen.

Das Eindringen über intakte Oberflächen kann mechanisch durch Ausbildung eines komplizierten Eindringungsapparates erfolgen. Zu Beginn der Penetration enzystiert sich die Zoospore an Wurzelhaaren und verbleibt dort für einige Stunden. Während dieser Zeit bildet sich ein komplizierter Eindringungsapparat aus. Er besteht aus einem Stachel, der in ein Rohr eingebettet ist. Kurz vor der Penetration dehnt sich die Vakuole in der Zyste aus und bildet ein Adhäsorium (knollenförmige Ausstülpung), das die Zoospore fest auf dem Wurzelhaar haften läßt. Während der Penetration wird der Stachel durch die Kutikula und die Zellwand hindurchgestoßen und bricht unterhalb der Zellwand ab. Durch die Bruchstelle schiebt sich ein schlanker Schlauch, an dessen Ende der Protoplast des Parasiten in die Wirtszelle entlassen wird. Der Penetrationsvorgang ist binnen weniger Sekunden abgeschlossen, die Anheftung von Pilzstrukturen ist dabei so fest, daß Drücke von 8 MPa im Appressorium gemessen werden können[56].

Eine weitere Möglichkeit des Eindringens von Pilzen in intakte Oberflächenstrukturen bietet die Bildung von kutikula- und zellwandauflösenden Enzymen. Meist kommt es zur Bildung von Kutinasen, welche die Esterbindung im Kutin lösen und somit die Pflanzenoberfläche verändern und eine Oberfläche mit möglicherweise verbesserten Hafteigenschaften schaffen. Beim eigentlichen Penetrationsvorgang spielen chemische und enzymatische Mechanismen ebenfalls eine wichtige Rolle. Auch hier scheint den Kutinasen eine entscheidende Bedeutung zuzukommen.

Keimende Konidien von *Fusarium solani* f.sp. *pisi* bilden beispielsweise geringe Mengen an Kutinasen. Nach dem Kontakt mit der Kutikula reichen diese Mengen aus, um Esterbindungen im Kutin zu lösen. Die freigesetzten Kutinfragmente induzieren dann die Neusynthese weiterer Kutinasen in der Pilzhyphe. Das Einbringen des Kutinasegens aus *Fusarium solani* in das Genom des Wundpathogens *Mycosphaerella* sp.der Papayafrucht befähigt den Ascomyceten, die Frucht durch die intakte Kutikula zu infizieren. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluß zu, daß Kutinasen zumindest bei *Fusarium* einen Virulenzfaktor darstellen[57].

II. Aufgabenstellung und Kenntnisstand

Bei der untersuchten Pflanze *Cyperus esculentus* handelt es sich um ein Riedgras (Cyperaceae, Sauergräser), eine Familie, die mit den Gramineen eng verwandt ist. *Cyperus esculentus* wird auch als Erdmandel, Erdnuß, Tigernuß, Entenkartoffel, eßbare Kleinigkeit oder Chufa (Spanisch: chufar - lachen) bezeichnet. Die Pflanze bildet unterirdisch eßbare, nußartige Knöllchen aus, die als Untersuchungsmaterial für diese Arbeit dienten. Die Erdmandel ist in den Tropen Ostafrikas beheimatet und diente bereits im alten Ägypten bis in die heutige Zeit als Kulturpflanze. Die mehrjährige Pflanze bildet dünne unterirdische Ausläufer aus; die Knöllchen werden an den faserigen Wurzeln der Pflanze gebildet und können bis zu einem Meter vom Spross entfernt sein. Sie werden dann wieder zur Saat und Fortpflanzung der Pflanze verwendet. Die Knollen sind sehr proteinreich, enthalten 30 % Öl und viele Vitamine. Verwendung finden sie in der Viehfütterung von Schweinen, Enten und Truthähnen, die sich für die Knöllchen anscheinend so begeistern, daß sie, wenn sie einmal an einem Platz in der Wildbahn fündig geworden sind, immer wiederkehren und auf diese Weise in Amerika ein beliebtes und leicht erjagbares Wild darstellen. Nicht zuletzt stellt die Pflanze in asiatischen und tropischen ostafrikanischen Ländern ein wichtiges Nahrungsmittel dar. In Spanien werden aus den Knöllchen und Milch ein beliebter Milchshake hergestellt, der in Bars und Restaurants als ein an Kokosnuß und Ananas erinnerndes Erfrischungsgetränk serviert wird (http://www.chufa.com/ http://www.GardenBed.com).

Ziel dieser Arbeit ist die weitere Reinigung und Charakterisierung des *Cyperus-esculentus*-Faktors sowie die Untersuchung seiner antifungalen Potenz gegen Pflanzenpathogene.

III. Allgemeiner Teil

III.1 Isolierung und Charakterisierung des Faktors aus *Cyperus esculentus*

III.1.1 Herstellung des Rohextraktes

Die Knollen von *Cyperus esculentus* wurden fein zermahlen und die agglutinierende Aktivität mit Millipore-Wasser unterschiedlichen pH-Wertes oder 0.05 M Tris/HCl, pH 6.4, 0.1 M NaCl, 0.02 % NaN_3 („Erythrozytenpuffer“, siehe Methodenteil) extrahiert. Nach der Extraktion wurde zentrifugiert und der die agglutinierende Aktivität enthaltende Überstand zur vollständigen Fettabtrennung filtriert. Der auf diese Weise erhaltene Rohextrakt diente als Untersuchungsmaterial.

III.1.2 Untersuchung auf agglutinierende Aktivität

Die agglutinierende Aktivität wurde mit Hilfe des für Lectine üblichen Hämagglutinationsassays durchgeführt. Dies ist ein relativ einfaches Verfahren, bei dem die Fähigkeit der Lectine, Zuckerstrukturen auf der Oberfläche von Membranen bzw. Zellwänden unterschiedlicher Zelltypen wie Erythrozyten, Lymphozyten und auch von Protozoen, Pilzen und Bakterien spezifisch zu erkennen und zu vernetzen, analytisch genutzt wird. Für diese Arbeit beschränkte sich der Einsatz auf Erythrozyten humanen Ursprungs.
Beim Agglutinationstest wird eine Verdünnungsreihe der zu prüfenden Substanz mit einer definierten Menge einer 2 - 4 % igen Erythrozytensuspension in einer Titerplatte versetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wird der Vernetzungsgrad der Erythrozyten abgelesen. Die Vernetzung der Zellen ist durch eine gleichmäßige Rotfärbung der Napfböden zu erkennen; findet keine Quervernetzung (Agglutination) der Erythrozyten statt, sammeln sie sich in der konischen Vertiefung der Napfböden und bilden dort einen roten Punkt. Der numerische Wert der Lectinverdünnung, der gerade noch eine Agglutination hervorruft, wird als Titer bezeichnet.

III.1.2.1 Titer in Abhängigkeit vom pH-Wert des Extraktionsmediums

Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses des Extraktions-pH-Wertes auf den Titerwert des resultierenden Rohextraktes wurden drei verschiedene Ansätze untersucht:
Der erste Ansatz wurde mit Millipore-Wasser, dessen pH-Wert zuvor mit HCl auf pH 4 eingestellt wurde, durchgeführt.

Der zweite Ansatz wurde in Millipore-Wasser durchgeführt. Der pH-Wert wurde zunächst mit HCl auf pH 1 eingestellt, dann mit auf NaOH auf pH 4 erhöht.
Der dritte Ansatz erfolgte in Erythrozytenpuffer, dessen pH-Wert auf pH 6.4 eingestellt wurde, da ab einem pH-Wert von 7.0 der Faktor aus *Cyperus esculentus* unlöslich ist (siehe III.2.5).
Im Anschluß daran wurde der pH-Wert mit NaOH auf 9 - 10 eingestellt, der erhaltene weiße Niederschlag abzentrifugiert und wieder bei pH 4 in dest. Wasser gelöst. Diese alkalische Fällung wurde noch einmal wiederholt und die Lösung des zweiten Niederschlages lyophilisiert[28]. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 - 3 zusammengefaßt.

Reinigung des *Cyperus-esculentus*-Faktors aus 1g Material:

Tabelle 1: Extraktion mit Wasser pH 4

	mg Protein (A_{280} x ml)	**Aggl.-menge (Titer x ml)**	**Ausbeute (%)**	**spez. Aktivität**	**Reinigungs-Faktor**
Rohextrakt	4.79	13	100	2.71	1
1. Fällung	1.62	10	76	6.17	2.3
2. Fällung	0.46	8	61	17.4	6.4

Tabelle 2: Extraktion mit Wasser (pH 1→ pH 4)

Rohextrakt	2.65	6.2	100	2.34	1
1. Fällung	0.8	5	81	6.25	2.7
2. Fällung	0.33	4	66	12.1	5.2

Tabelle 3: Extraktion mit Erythrozytenpuffer pH 6.4

Rohextrakt	1.45	7.1	100	4.9	1
1. Fällung	0.43	5	70	11.6	2.4
2. Fällung	0.051	4	56	78.4	16

Die spezifische Aktivität ist definiert als der Quotient aus Agglutinationsmenge und mg Protein pro ml.
Die Agglutinationsmenge im ersten Ansatz liegt etwas höher als in den beiden anderen Ansätzen. Die 1. und 2. Fällungsreaktion bringt in allen drei Ansätzen etwa gleich große prozentuale Ausbeuten hervor, der Proteingehalt nimmt in allen Fällen ab. Im Falle des dritten Ansatzes wird er jedoch überdimensional klein. Daraus resultieren sehr hohe spezifische Aktivitäten, die dann

entsprechend hohe Reinigungsfaktoren hervorbringen und auf einen guten Reinigungseffekt schließen lassen.

III.1.2.2 Titer in Abhängigkeit von der Ionenstärke im Extraktionspuffer

Zur Optimierung der Extraktionsbedingungen und Bestimmung einer möglichen Abhängigkeit der agglutinierenden Aktivität von der Ionenstärke wurde der Einfluß der Ionenstärke auf die Effizienz der Extraktion anhand verschiedener Rohextrakte unter NaCl-Zusatz in einem Konzentrationsbereich von 0 - 1.0 mol/ l getestet. Die Bestimmung der Agglutination erfolgte wie unter III.1.2 im Titertest.
Es wurden 6 Ansätze mit je 5 g der gemahlenen Knollen in je 25 ml 0.05 M Acetatpuffer, pH 4.5 suspendiert und den Extraktionspuffern unterschiedliche Konzentrationen an NaCl (0, 0.1 M, 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1.0 M) zugesetzt. Mit den so erhaltenen Rohextrakten (siehe III.1.1) wurde der Titertest durchgeführt.

Tabelle 4: Titer in Abhängigkeit von der Ionenstärke

NaCl-Konz. (mol/ l)	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0
Titer	4	2-4	2-4	2-4	4	4

Der Titer ist unabhängig von der NaCl-Konzentration des Extraktionspuffers.

III.1.3 Bestimmung der Zuckerbindungsspezifität

Die Agglutinationskraft der Lectine kann durch Zucker oder Glykoproteine kompetitiv gehemmt werden. Viele Lectine können aufgrund der Art der für sie spezifischen Hemmzucker in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die Bestimmung der Zuckerbindungsspezifität im Hemmtest dient zur Ermittlung geeigneter Affinitätsmedien zur Isolierung und Reinigung von agglutinierenden Substanzen.
Für diesen Versuch wurden die oben genannten Rohextrakte mit Titer 4 verwendet. Die Zucker wurden mit einer Konzentration von 0.2 mol/ l eingesetzt. Die Konzentration der Glykoproteine betrug 1 mg/ ml. In einer Mikrotiterplatte wird in 0.05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.02 % NaN_3 eine Verdünnungsreihe der Zucker bzw. Glykoproteine erstellt und dann eine definierte Menge des Rohextraktes in jede Vertiefung der Platte zu den Zuckerlösungen pipettiert.

Tabelle 5: Minimale Hemmkonzentrationen

Zucker/ Glykoprotein	RE 1	RE 2	RE 3
D-Galactosamin	25 mmol/ l	25 mmol/ l	25 mmol/ l
D-Glucosamin	50 mmol/ l	25 mmol/ l	25 mmol/ l
D-Mannosamin	50 mmol/ l	25 mmol/ l	25 mmol/ l
Ovomucoid	0.25 mg/ ml	0.25 mg/ ml	0.25 mg/ ml
Asialoovomucoid	0.125 - 0.25 mg/ ml	0.125 - 0.25 mg/ ml	0.125 - 0.25 mg/ ml

Die agglutinierende Aktivität konnte durch D-Glucosamin, D-Mannosamin, D-Galactosamin und Ovomucoid gehemmt werden.
Keine Hemmwirkung zeigten bis zu einer Konzentration von 300 mmol/ l D-Glucose, L-Fucose, D-Galactose, D-Fructose, D-Mannose und bis zu einer Konzentration von 1.5 mg/ ml Fetuin, Asialofetuin und desialysiertes Schweinemagen-Mucin.

III.1.4 Untersuchung der Agglutinationskraft verschiedener Ionen

Mehrwertige Ionen können eine Art Agglutination vortäuschen. Andererseits besitzen sie auch die Fähigkeit, Proteinen ihre Hydrathülle zu entziehen („Entsalzung“) und dadurch möglicherweise die Bindungsbereiche für Kohlenhydratstrukturen leichter zugänglich zu machen.

III.1.4.1 Testreihe mit Ammoniumsulfat

Wird die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) als Reinigungsmethode angewendet, müssen Proteine in einer Lösung mit hohem Salzgehalt auf die Säule aufgetragen werden (siehe III.3.4). Zur Untersuchung der Fraktionen auf Lectingehalt dient der Agglutinationstest. Um eine Vortäuschung der Agglutination ausschließen zu können, wurden daher verschiedene Ionen untersucht. Der Titertest wurde für einen Konzentrationsbereich von 1 M - 2 M durchgeführt.

Tabelle 6: Titer in Anwesenheit von $(NH_4)_2SO_4$

	1.0 M	1.5 M	1.7 M	2.0 M
Titer	0	0	2-4	2-4

III.1.4.2 Testreihe mit Natriumchlorid

siehe III.1.4.1

Der Titertest wurde für einen Konzentrationsbereich von 1 M - 4 M durchgeführt.

Tabelle 7: Titer in Anwesenheit von NaCl

	1.0 M	2.0 M	3.0 M	4.0 M
Titer	0	0	0	0

III.1.4.3 Testreihe mit Calciumacetat

Zugrundeliegender Untersuchungsbereich 0.1 M - 1M.

Tabelle 8: Titer in Anwesenheit von $Ca(OAc)_2$

	0.1 M	0.5 M	1.0 M
Titer	0	8	4-8

III.1.4.4 Testreihe mit Magnesiumchlorid

siehe III.1.4.3

Untersuchter Konzentrationsbereich 0.1 M - 2 M.

Tabelle 9: Titer in Anwesenheit von $MgCl_2$

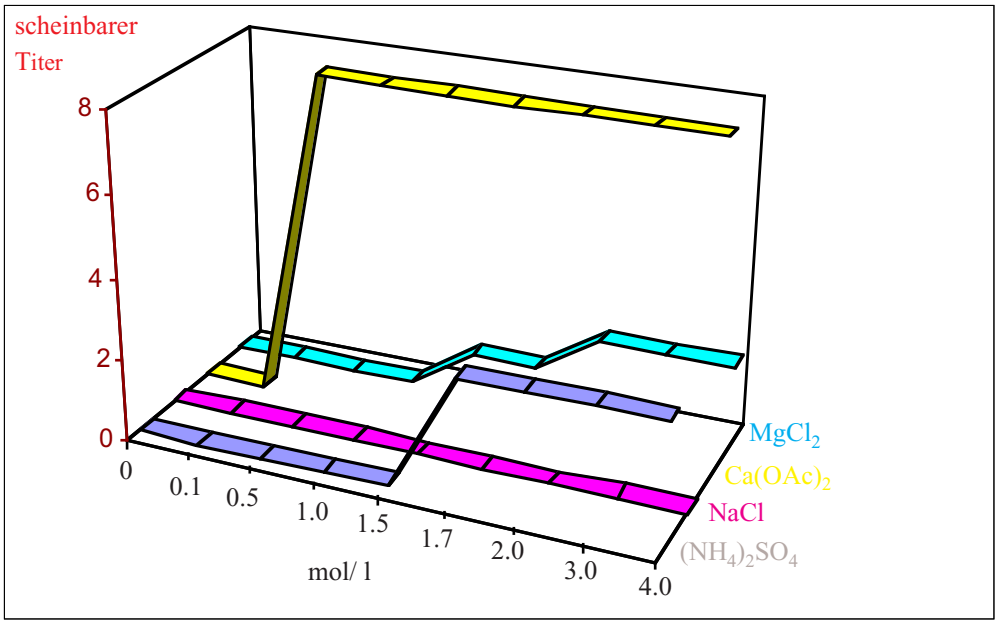
	0.1 M	0.5 M	1.0 M	1.5 M	2.0 M
Titer	0	0	0	0-2	2

Kommt Ammoniumsulfat in höheren Konzentrationen zum Einsatz (ab 1.7 M) wird eine Agglutination vorgetäuscht. Dies ist beispielsweise bei der nachfolgend angeführten hydrophoben Interaktionschromatographie (III.3.4) von Bedeutung.

Natrium- und Magnesiumionen beeinflussen die Agglutination nicht bzw. erst ab höheren Konzentrationen (1.5 - 2.0 M).

Calciumionen zeigen bereits ab einer Konzentration von 0.5 M eine Art Agglutinationsphänomen.

Abb. 3: Agglutinationskraft verschiedener Ionen



III.2 Isolierung und erste Reinigung

III.2.1 Fällung mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung

Die Präzipitation von Proteinen kann zur groben Vorreinigung von Proteingemischen eingesetzt werden. Weitere Anwendung findet sie zur Abtrennung der Proteine von anderen Substanzen wie Lipiden und Kohlenhydraten.

Die am häufigsten angewandte Methode zur Fällung von Proteinen ist die Zugabe anorganischer Salze wie Ammoniumsulfat. Die Ionen beanspruchen für die Ausbildung ihrer Hydrathülle viel Wasser. Ab einem bestimmten Punkt steht nicht mehr genug Wasser für die Wechselwirkung mit den Proteinen zur Verfügung, und diese beginnen auszufallen (sog. „Aussalzen“). Dieses Verfahren dient zur fraktionierten Fällung von Proteinen, sowie zur Abtrennung von anderen Substanzen und eignet sich daher als erster Reinigungsschritt eines Proteins.

Zur Ausfällung von Proteinen wurde dem Rohextrakt bis zu verschiedenen Sättigungsgraden Ammoniumsulfat zugesetzt. Nach Zentrifugation der Proben wurde sowohl der Titer der Überstände als auch der der gelösten Rückstände untersucht. Der Titer des eingesetzten Rohextraktes betrug $2^2 = 4$.

In Parallelansätzen wurden zu je 1 ml Rohextrakt berechnete Mengen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bis zu einer 60 bis 80 % igen Sättigung zugesetzt.

Tabelle 10: Fällung mit einer gesättigten $(NH_4)_2SO_4$-Lösung

Sättigungsgrad (%)	60	65	70	75	80
Ammoniumsulfatlösung-Zusatz (ml)	1.03	1.28	1.60	2.06	2.72
Titer des Überstandes	16	8 - 16	8 - 16	8 - 16	8 - 16
Titer des gel. Niederschlages	0	0	0	0	0

Die Menge an zugesetzter gesättigter Ammoniumsulfatlösung berechnet sich nach folgender Formel[58]:

$$c_0 \text{ x } V_0 - c_i \text{ x } V_0 / c_i - c_a = V_a$$

Parameter:
c_0 = Startkonzentration der $(NH_4)_2SO_4$ - Lösung
c_i = gewünschte Endkonzentration der $(NH_4)_2SO_4$ - Lösung
c_a = Konzentration der zuzugebenden $(NH_4)_2SO_4$ - Lösung
V_0 = Anfangskonzentration der Proteinlösung
V_a = Volumen der zuzugebenden $(NH_4)_2SO_4$ - Lösung

Die agglutinierende Aktivität befindet sich in allen Fällen im Überstand. Durch die Ammoniumsulfat-Fällung wird der agglutinierende Faktor demnach selbst nicht, Fremdproteine möglicherweise jedoch ausgefällt und dadurch abgetrennt.
Die erhöhten Titerwerte (Titerwert des Rohextraktes = 4) sind auf die Fähigkeit der $(NH_4)_2SO_4$-Ionen eine Agglutination vorzutäuschen, zurückzuführen (siehe III.1.4.1).

III.2.2 Fällung mit festem Ammoniumsulfat

Der Rohextrakt wurde entsprechend einer 85 - 88 % igen Sättigung mit festem Ammoniumsulfat versetzt. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 10.000 RPM) wurde der pH-Wert, der Titer und die $A_{(280)}$ des Überstandes sowie des gelösten Niederschlages überprüft.

Tabelle 11: $(NH_4)_2SO_4$-Fällung u. Proteinbestimmung

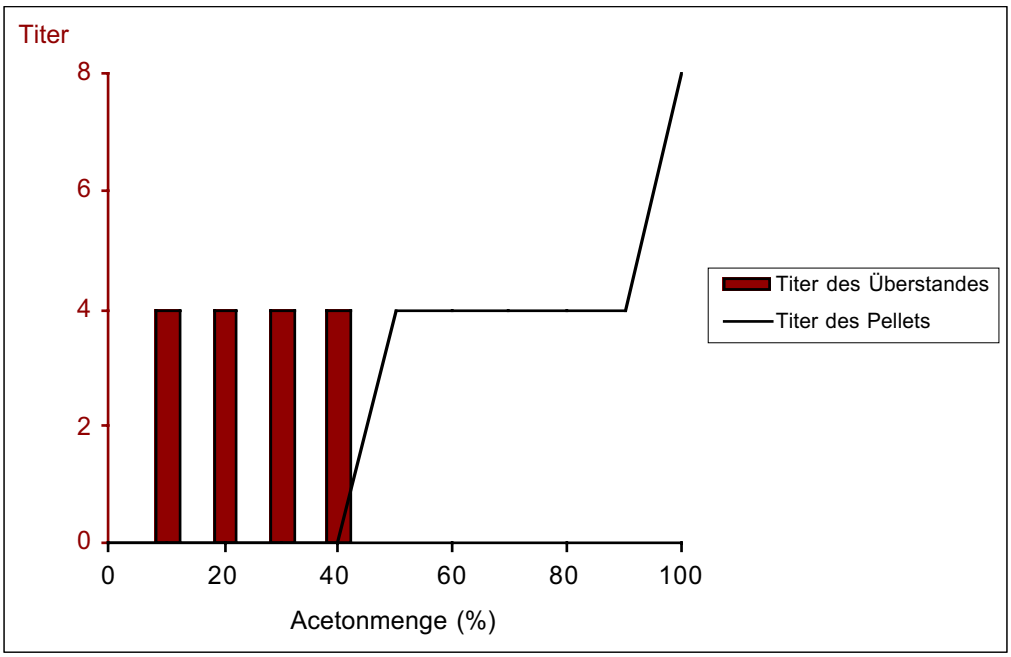
	Titer	pH-Wert	$A_{(280)}$
Überstand nach $(NH_4)_2SO_4$ -Fällung	16 - 32	4.3	1.683
gel. Niederschlag nach $(NH_4)_2SO_4$ -Fällung	0	4.6	1.720

Die aggl. Aktivität befindet sich im Überstand. Der Niederschlag scheint Fremdproteine abzutrennen.

III.2.3 Fällung mit Aceton unter Eiskühlung

Durch Zugabe von Aceton erfolgt ebenfalls eine Ausfällung von Proteinen. Da bei Verwendung organischer Lösungsmittel die Denaturierung der Proteine zu befürchten ist, wurde der Versuch unter Eiskühlung durchgeführt. Nach Zentrifugation wurden die Überstände und die aufgelösten Rückstände auf ihre Titeraktivität untersucht.
Es wurden 10 Versuche angesetzt. Zu je 1 ml Rohextrakt wurden 100 - 1000 µl Aceton pipettiert. Bei Zugabe von 600 µl trat erstmals eine sichtbare Trübung auf. Nach der anschließenden Zentrifugation wurden die Überstände in Eppendorf-Caps überführt, die Niederschläge in Millipore-H_2O pH 3.6 gelöst, zentrifugiert und dem Titertest unterzogen. Die Niederschläge lösten sich hierbei nicht vollständig auf.

Abb. 4: Fällung mit Aceton unter Eiskühlung

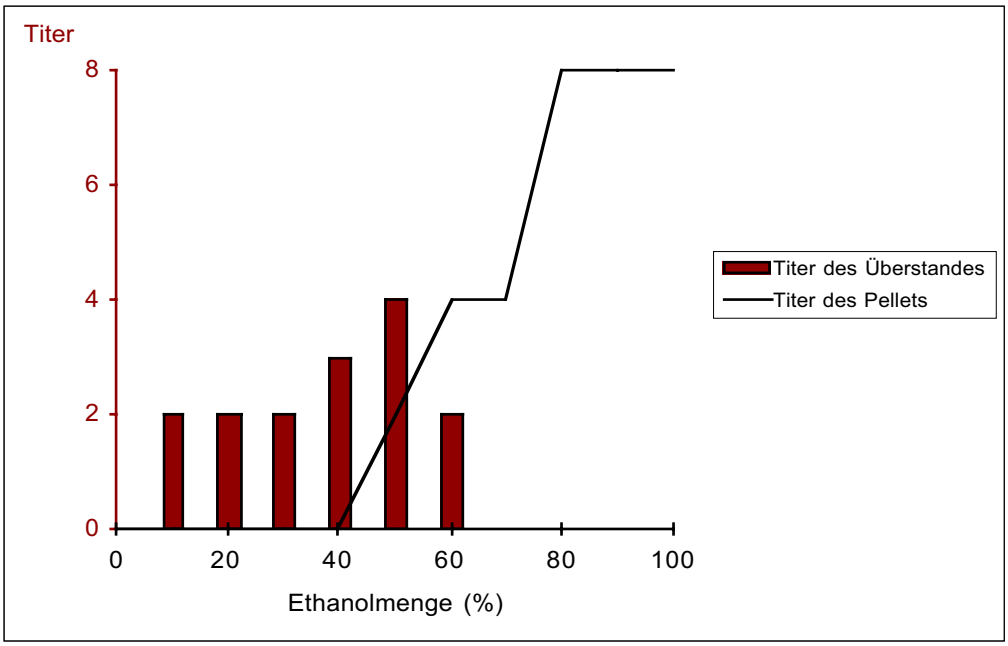


Ab 50 % Aceton-Zugabe ist die agglutinierende Aktivität im aufgelösten Niederschlag nachweisbar.

III.2.4 Fällung mit Ethanol unter Eiskühlung

siehe III.2.3

Abb. 5: Fällung mit Ethanol unter Eiskühlung



Ab 50 % Ethanol-Zugabe ist die aggl. Aktivität im aufgelösten Niederschlag zu finden.

III.2.5 Reinigung durch pH-Fällung

Eine weitere Möglichkeit zur Proteinfällung stellt die Alkalisierung einer Lösung dar. Vorversuche hatten gezeigt, daß bei einem pH-Wert von 6 der erste Niederschlag einsetzt und ab pH 7 die agglutinierende Aktivität vollständig im Niederschlag zu finden ist.

Der Rohextrakt wurde mit zweimal nacheinander mit NaOH auf pH 9 - 10 eingestellt und wie in III.1.2.1 beschrieben weiterverfahren. Die Lösung des zweiten Niederschlages wurde gefriergetrocknet.

Für die anschließende Reinigung mittels Gelfiltration an Sephadex G-25 wurden 30 mg der lyophilisierten Substanz in 8 ml dest. Wasser unter Zugabe von 2 Tropfen 4 M HOAc gelöst. Um ungelöste Teilchen abzutrennen, wurde die Lösung zentrifugiert. Die Lösung wurde auf die Säule aufgetragen und die Chromatographie bei 4 °C durchgeführt.

Zur Ermittlung des Elutionspeaks wurden die Absorptionen der einzelnen Fraktionen bei 280 nm

gemessen die relevanten Fraktionen vereinigt und gefriergetrocknet.

Es wurden jeweils vom Rohextrakt, sowie den verschiedenen Reinigungsstufen die Titer bestimmt.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit der BCA-Methode[59].

Tabelle 12: Bilanz der Reinigung des *Cyperus-esculentus*-Faktors durch alkalische Fällung

	Protein-menge (mg)°	**Aggl. menge (Titer x ml)**	**Ausbeute (%)**	**spez. Aktivität**	**Reinigungs-faktor**
Rohextrakt (aus 200 g Knollen = 800 ml)	1816	12800	100	7.05	1
Extrahierte Substanz nach 2. Fällung	16.8 (876.5 mg)*	9600	75	571	81
Extrahierte Substanz nach 2. Fällung u. Gelfiltration an Sephadex G25	21.04 (19.7 mg)*	10440	81.5	1000	143

* mg Ausbeute nach Lyophilisation
° Gesamtprotein bestimmt nach BCA-Methode

Die alkalische Fällung[28] erwies sich als erster Reinigungsschritt gegenüber den anderen angeführten Fällungsmethoden als vorteilhaft und wurde aus diesem Grund beibehalten.

III.3 Isolierung und Optimierung der Reinigung

III.3.1 Reinigung mittels Gelfiltration

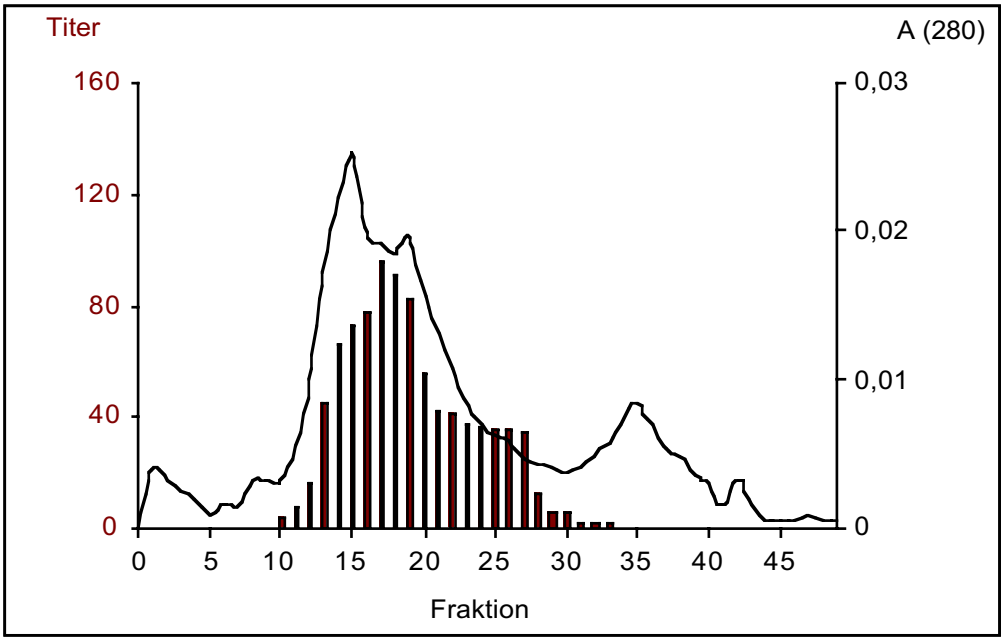
Die Gelfiltration (Ausschlußchromatographie) trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Für das Trennverhalten ist das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle verantwortlich, und die Trenngele sind durch einen wirkungsvollen Einsatzbereich charakterisiert, bei dem die Molekülgröße in einem kritischen Verhältnis zu den Poren steht. Moleküle ab einer bestimmten Größe können nicht in die Poren des Trenngels eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschlussvolumen V_0. Kleinere Moleküle bewegen sich nicht nur ungehindert zwischen den einzelnen Teilchen der stationären Phase, sondern dringen außerdem auch in ihre Poren ein. Dadurch erfahren sie eine Verzögerung, und ihr Elutionsvolumen V_m entspricht der Summe des internen Porenvolumens und des Partikelzwischenraums. Die kleinsten Komponenten haben somit die längste Aufenthaltsdauer in den Poren und werden zuletzt eluiert. Die mobile Phase dient nur als Lösungsmittel und hat keinen direkten Einfluß auf die Trennung.
In der Literatur werden mehrere Bezeichnungen für diese Trennmethode synonym verwendet. Die Ausschlußchromatographie (size exclusion chromatography, SEC) wird im Fall von wäßrigen Trennsystemen auch als Gelfiltrations-Chromatographie (GFC) und bei nicht-wäßrigen Trennsystemen als Gelpermeations-Chromatographie (GPC) bezeichnet. Diese Begriffe gehen auf die ersten Anwendungen zurück, bei denen quervernetztes, gel-artiges Dextran und wässrige Puffer verwendet wurden, während Experimente im Jahre 1964 mit einer Polystyrol-Matrix und organischen Lösungsmitteln durchgeführt wurden und die Bezeichnung Gelpermeation prägten[60-62].

III.3.1.1 Gelfiltration an Sephadex G-25

Sephadex ist ein perlartiges Gel, das aus quervernetztem Dextran (α-1,6-glycosidisch verknüpfte Glucose mit 1,2-, 1,3- und 1,4-Verzweigungen) besteht. Die Quervernetzung des Dextrans erfolgt mit Epichlorhydrin unter alkalischen Bedingungen.
Die Gelfiltration wurde zunächst an Sephadex G-25 durchgeführt, das eine Ausschlußgrenze von 25 kDa besitzt. Die nach zweimaliger alkalischer Fällung gewonnene lyophilisierte Substanz wurde hierfür in Millipore-Wasser gelöst, filtriert und chromatographiert. Die Elution erfolgte ebenso mit Millipore-Wasser. Die erhaltenen Fraktionen wurden photometrisch bei 280 nm[63,64] vermessen, und der Titer der einzelnen Fraktionen mittels Hämagglutinationsassay bestimmt. Zur

Ermittlung des Gesamtproteingehaltes wurde die BCA-Methode[59] herangezogen.

Abb. 6: Gelfiltration an Sephadex G-25



Säule: Sephadex G-25 (Pharmacia), 14 x 2.5 cm
Probe: 30 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung, gelöst in 8 ml Millipore-Wasser
Elutionsmittel: Millipore-Wasser
Fraktionierung: 1.5 ml/2 min

Ergebnis:

Tabelle 13: Bilanz der Gelfiltration an Sephadex G-25

	Protein-menge (mg)°	**Aggl. menge (Titer x ml)**	**Ausbeute (%)**	**spez. Aktivität**	**Reinigungs-faktor**
Lyophilisierte Substanz nach 2. Fällung	0.6	128	100	213	1
Lyophilisierte Substanz nach 2. Fällung u. Gelfiltration an Sephadex G-25	0.413	128	100	310	1.46

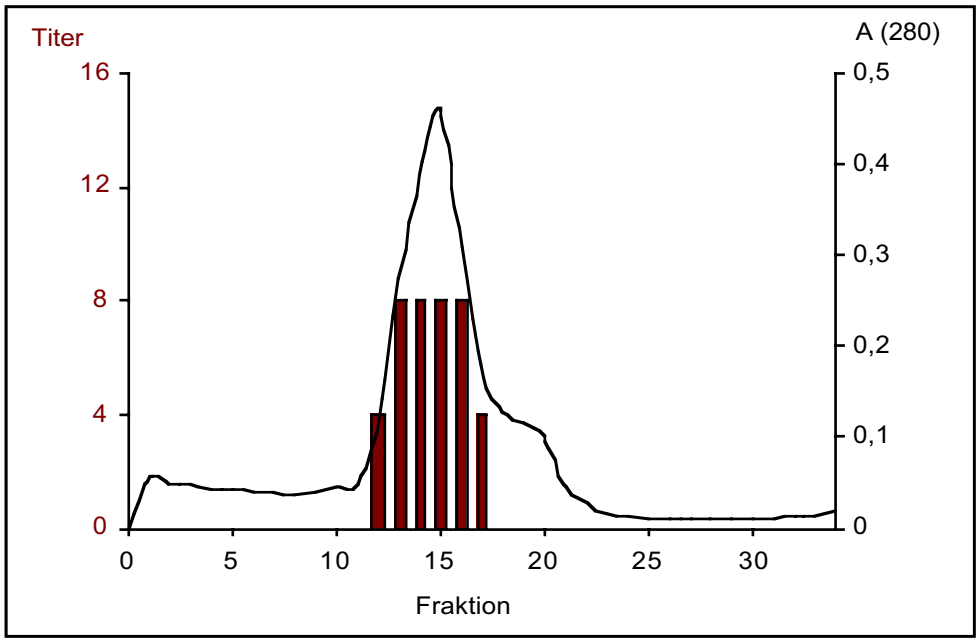
° Gesamtprotein bestimmt nach BCA-Methode

Durch die Gelfiltration an Sephadex G-25 werden UV-absorbierende Fremdstoffe abgetrennt, ohne daß es zu einem Aktivitätsverlust kommt. Die im Titertest aktiven Fraktionen wurden vereinigt, gegen Millipore-Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

III.3.1.2 Gelfiltration an Sephadex G-10

Als weitere Matrix zur Gelfiltration diente Sephadex G-10, das über eine Ausschlußgrenze von 10 kDa verfügt.

Abb. 7: Gelfiltration an Sephadex G-10



Säule: Sephadex G-10 (Pharmacia), 14 x 2.5 cm
Probe: 30 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung gelöst in 8 ml Millipore-Wasser
Elutionsmittel: Millipore-Wasser
Fraktionierung: 1.5 ml/3 min

Tabelle 14: Bilanz der Gelfiltration an Sephadex G-10

	Protein-menge (mg)°	**Aggl. menge (Titer x ml)**	**Ausbeute (%)**	**spez. Aktivität**	**Reinigungs-faktor**
Lyophilisierte Substanz nach 2. Fällung	0.6	128	100	213	1
Lyophilisierte Substanz nach 2. Fällung u. Gelfiltration an Sephadex G-10	0.594	128	100	215	1.012

° Gesamtprotein bestimmt nach BCA-Methode

Wie im Chromatographieverlauf zu sehen ist, werden durch die Gelfiltration an Sephadex G-10

keine Fremdsubstanzen abgetrennt. Die agglutinierende Aktivität eluiert ohne Verluste als einheitliche Substanz.
Wie später angeführt (siehe unter III.4.3) war es an dieser Stelle notwendig, nach weiteren Möglichkeiten der Reinigung für die agglutinierende Aktivität aus *Cyperus esculentus* zu suchen, um den Reinigungsfaktor zu erhöhen und Fremdsubstanzen abzutrennen.

III.3.2 Reinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls (Adsorbent) an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner. Typische Bindungspartner sind beispielsweise Antigene und Antikörper, Glycoproteine und Lectine, Enzyme und Coenzyme. Ein verfügbarer, affiner Bindungspartner wird kovalent an eine Matrix gebunden und dient als immobilisierter Ligand. Die biospezifische Wechselwirkung mit dem Zielmolekül wird genutzt, um diesen Adsorbenten selektiv aus einer komplexen Mischung heraus zu adsorbieren. Die Elution des Adsorbenten wird dann entweder durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung erreicht oder durch einen Konformationswechsel aufgrund einer Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke. Die Affinitätschromatographie ist die Trennmethode mit der größten Spezifität und Selektivität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen.
Biospezifische Wechselwirkungen für die Affinitätschromatographie besitzen Bindungskonstanten k_D in der Größenordnung von etwa 10^{-5} bis 10^{-7} M. Bei größeren k_D- Werten von z. B. 10^{-4} M wird die Bindung zu schwach, um für die Chromatographie nutzbar zu sein. Andererseits wird die Bindung zu stark, wenn k_D kleiner als 10^{-8} M ist. Die Elution ist dann nur unter denaturierenden oder inaktivierenden Bedingungen möglich.

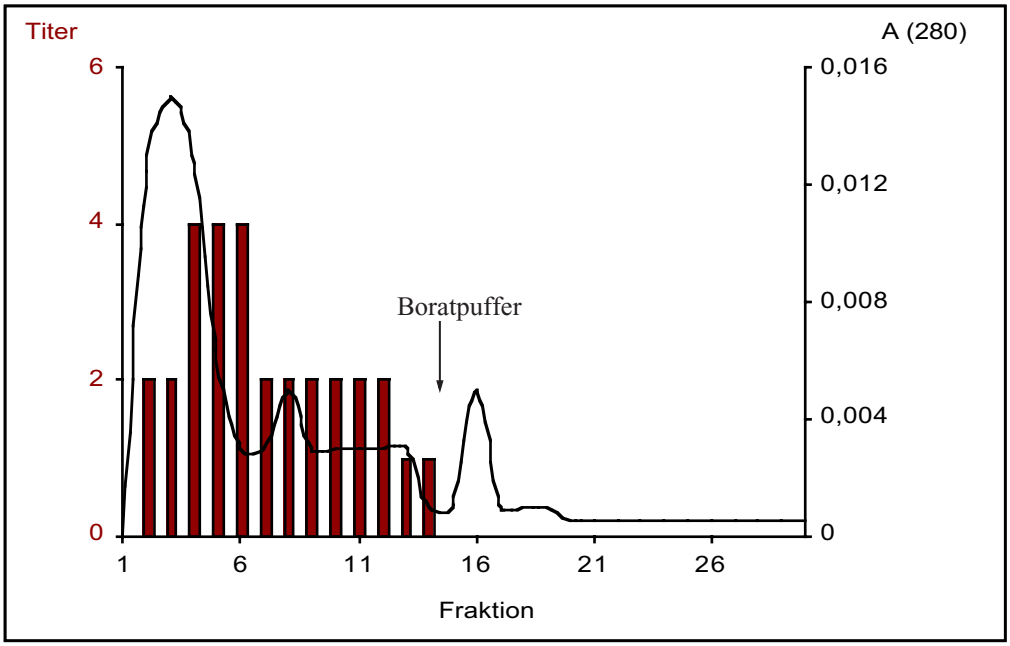
III.3.2.1 Affinitätschromatographie an Chitosan

Chitin ist ein natürlich vorkommendes N-haltiges Polysaccharid, das aus β-1,4-glycosidisch verknüpften N-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten besteht. Zusammen mit Calciumcarbonat dient es als Gerüstsubstanz der Panzer von Krebsen, Insekten und Mollusken. In Würmern, Bakterien, Pilzen und Flechten ist es ein Zellwandbestandteil. Durch Deacetylierung des Homopolymers Chitin wird das Homopolymer Chitosan gewonnen.
Das Arbeiten mit Chitosan erwies sich als problematisch, da es einerseits im sauren pH-Bereich wasserlöslich ist und durch seine stark agglutinierende Wirkung den Nachweis des agglutinierenden Faktors im Hämagglutinationassay unmöglich macht, auf der anderen Seite die agglutinie-

rende Aktivität aus *Cyperus esculentus* oberhalb eines pH-Wertes von 7.0 zur Gänze unlöslich (siehe III.2.5) ist und ausfällt.

15 mg des Lyophilisats nach zweimaliger alkalischer Fällung wurden in 0.05 M Imidazolpuffer gelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die mit Chitosan gefüllte und mit dem Imidazolpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem 0.1 M Boratpuffer. Die auf diese Weise erhaltenen Fraktionen wurden dem Titertest unterzogen und auf agglutinierende Aktivität untersucht, sowie die Absorption bei 280 nm der einzelnen Fraktionen bestimmt.

Abb. 8: Affinitätschromatographie an Chitosan



Säule: Chitosan (Sigma), BIORAD Poly-Prep Chromatographiesäule (0.8 x 4 cm)
Probe: 15 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung, gelöst in 1 ml 0.05 M Imidazolpuffer pH 6.5
Elutionsmittel: 0.1 M Boratpuffer pH 6.5/ pH 9.0
Fraktionierung: 1 ml

Die agglutinierende Aktivität war im Durchlauf (Fraktion 1 - 13) zu finden. Eine Bindung des *Cyperus-esculentus*-Faktors an das Säulenmaterial gelang unter diesen Bedingungen nicht.

III.3.3 Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine häufig angewandte Trennmethode und wird oft als

erster Schritt einer Proteinreinigung eingesetzt. Die Grundlage für den Ionenaustausch ist die kompetitive Wechselwirkung geladener Ionen: Ein Probenmolekül konkurriert mit Salz-Ionen um die geladenen Positionen auf einer Ionenaustauscher-Matrix. In einem ersten Schritt bindet das Molekül an die fixierten Ladungen der stationären Phase, und im zweiten Schritt erfolgt die Elution des Proteins durch die steigende Salzkonzentration des Eluenten. Ein Protein trägt aufgrund der sauren oder basischen Seitengruppen einzelner Aminosäuren negative oder positive Ladungen. Im sauren pH-Bereich sind die Aminogruppen, hauptsächlich von Lys, Arg und His, protoniert und das Protein zeigt ein kationisches Verhalten. Dagegen überwiegen im basischen pH-Bereich die negativen Ladungen an den Seitenketten von Asp und Glu und das Protein tritt als Anion auf. Der Gesamtladungszustand ist somit abhängig vom pH-Wert der umgebenden Lösung. Diese amphotere Verhalten ist charakteristisch für Proteine.

III.3.3.1 Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose (Whatman CM-52)

75 mg des Lyophilisats nach zweimaliger alkalischer Fällung wurden in Natriumacetatpuffer pH 4.0 gelöst und auf die Säule gegeben. Zur Elution wurde ein Kochsalzgradient (0.1 M - 2.0 M) aufgebaut. Von den eluierten Fraktionen wurden die Absorption bei 280 nm und die Titeraktivität bestimmt.

Der Chromatographieverlauf zeigte große Unregelmäßigkeiten. Agglutination war ab einer Konzentration von 0.5 M NaCl immer wieder in vereinzelten Fraktionen vorhanden. Die Methode wurde daher nicht fortgeführt, zumal inzwischen erste Vorversuche zur Bindung der agglutinierenden Aktivität an hydrophoben Matrizes bessere Resultate erwarten liessen.

III.3.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose High Performance

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC, engl. hydrophobic interaction chromatography) wird die Wechselwirkung zwischen am Träger immobilisierten Alkylresten und hydrophoben Aminosäureresten der Proteine ausgenutzt. Die HIC kombiniert die Eigenschaften einer nicht-denaturierenden Salzpräzipitation (Aggregation aufgrund hydrophober Protein-Protein-Kontakte) mit der Separationskraft der Chromatographie (Wechselwirkung aufgrund hydrophober Protein-Matrix-Kontakte). Daraus ergibt sich der wesentliche Vorteil, daß die native Form und die biologische Aktivität des Proteins erhalten bleibt.

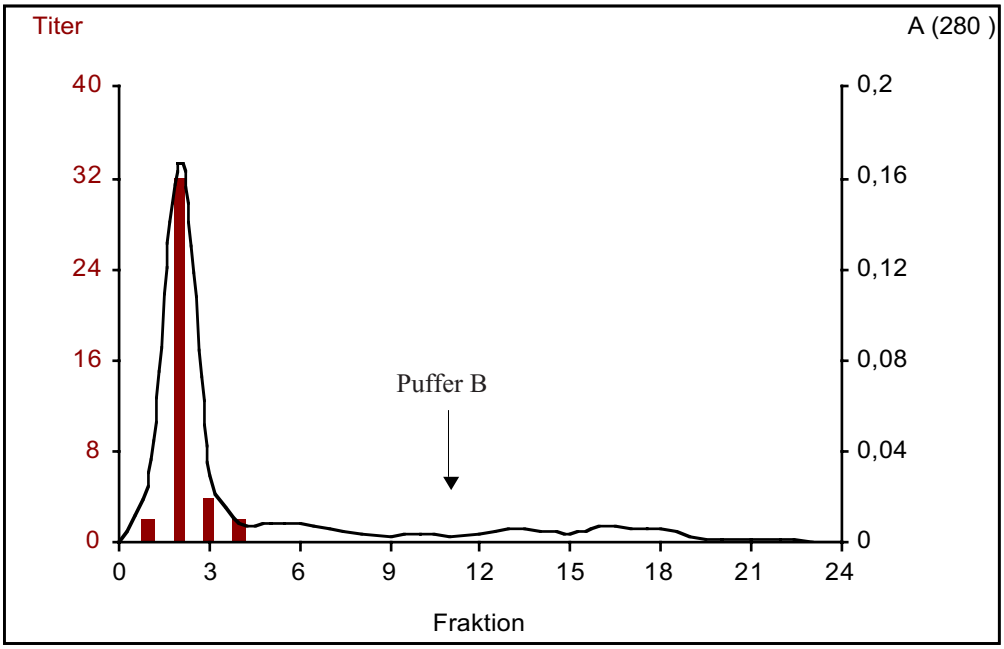
Die Proteinlösung wird in einem Puffer relativ hoher Ionenstärke auf die Säule aufgetragen (als Salze eignen sich besonders Ammoniumsulfat, Natriumchlorid oder Kaliumchlorid in Phosphat-

puffer). Bei hohen Salzkonzentrationen treten die unpolaren Regionen der Proteine an die Oberfläche und können an die schwach hydrophoben Liganden einer stationären Phase adsorbieren. Die Elution erfolgt anschließend stufenweise oder durch Wahl eines Lösungsmittelgradienten. Die mildeste Form der Elution stellt die Reduktion der Ionenstärke dar. Falls das zu keinem Erfolg führt, kann sich eine Elution mit einem chaotropen Lösungsmittel anschließen.

III.3.4.1 Vorversuche zur Bindung der agglutinierenden Aktivität

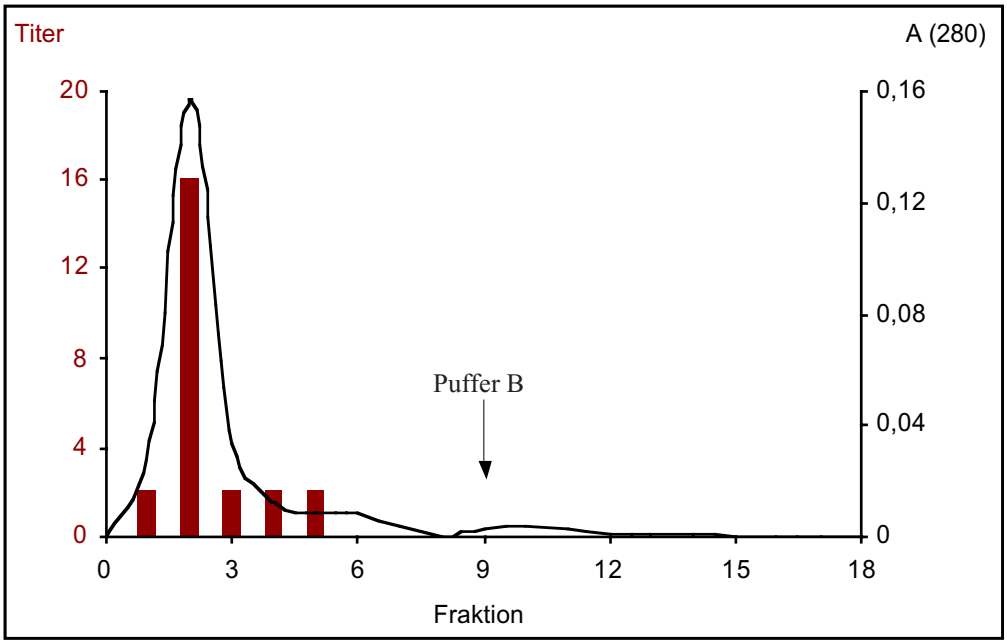
Die hydrophobe Chromatographie wurde zunächst mit drei verschiedenen Medien (Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Octyl Sepharose 4 Fast Flow und Phenyl Sepharose High Performance) zunehmender Apolarität und bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt.
Die agglutinierende Aktivität wurde gelöst in einem 1.5 M Ammoniumsulfat-Startpuffer mit einer Ionenstärke von 4.5 mol/ l aufgetragen.

Abb. 9: Hydrophobe Interaktionschromatographie an Butyl-Sepharose 4 Fast Flow



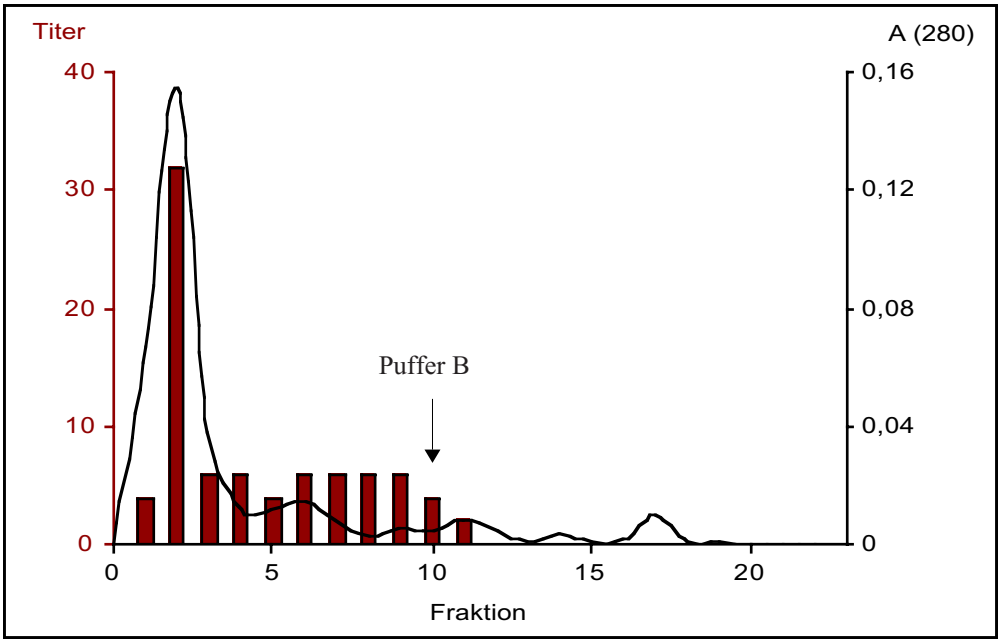
Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 1 cm)
Packmaterial: Butyl Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia)
Probe: 20 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.326, Titer: 32
Fraktionierung: 1 ml/ min
Puffer A: 1.5 M Ammoniumsulfat pH 5.4
Puffer B: 0.1 M Ammoniumsulfat pH 5.4
Pufferwechsel: ab Fraktion 11

Abb. 10: Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl Sepharose 4 Fast Flow



Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 1 cm)
Packmaterial: Octyl Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia)
Probe: 20 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.326, Titer: 32
Fraktionierung: 1 ml/ min
Puffer A: 1.5 M Ammoniumsulfat pH 5.4
Puffer B: 0.1 M Ammoniumsulfat pH 5.4
Pufferwechsel: ab Fraktion 9

Abb. 11: Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose High Performance



Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 1 cm)
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 20 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.342, Titer: 32
Fraktionierung: 1 ml/ min
Puffer A: 1.5 M Ammoniumsulfat pH 5.4
Puffer B: 0.1 M Ammoniumsulfat pH 5.4
Pufferwechsel: ab Fraktion 10

Wie in den Abbildungen 7 - 9 ersichtlich, wird die agglutinierende Aktivität von Butyl- über Octyl- bis zu Phenyl-Sepharose zunehmend auseinander gezogen. Ein großer Teil der agglutinierenden Aktivität befindet sich jedoch auch bei der Chromatographie an Phenyl-Sepharose im Durchlauf.

Daraus läßt sich für die weiteren Experimente ableiten, daß mit zunehmender Apolarität des Chromatographie-Mediums eine Verbesserung der Bindungsfähigkeit für den agglutinierenden Faktor aus *Cyperus esculentus* verbunden ist, die Versuchsbedingungen (Ionenstärke, pH-Wert) allerdings noch optimiert werden müssen.

Die anschließenden Versuche wurden an Phenyl Sepharose HP in BIORAD Poly-Prep Chromatographiesäulen (0.8 x 4 cm) durchgeführt. Als Salze kamen Natriumchlorid und Ammoniumsulfat in verschiedenen Konzentrationen (1.0 M - 4.0 M) in einem pH-Bereich von 4.5 bis 7.0 zum Einsatz. Später wurden die optimierten Versuchsbedingungen auf einen größeren Maßstab übertragen und auf eine größere Glaschromatographiesäule der Firma Pharmacia übergegangen.

III.3.4.2 Optimierung der Versuchsbedingungen für die Durchführung der HIC

III.3.4.2.1 HIC an Phenyl Sepharose HP, NaCl als Startpuffersubstanz

Um eine Bindung des agglutinierenden Faktors an das Säulenmaterial zu bewirken, kam zunächst NaCl in einer Molarität von 4.0 M bei verschiedenen pH-Werten zum Einsatz.

Die Ionenstärke einer Lösung kann mit folgender Gleichung berechnet werden[65]:

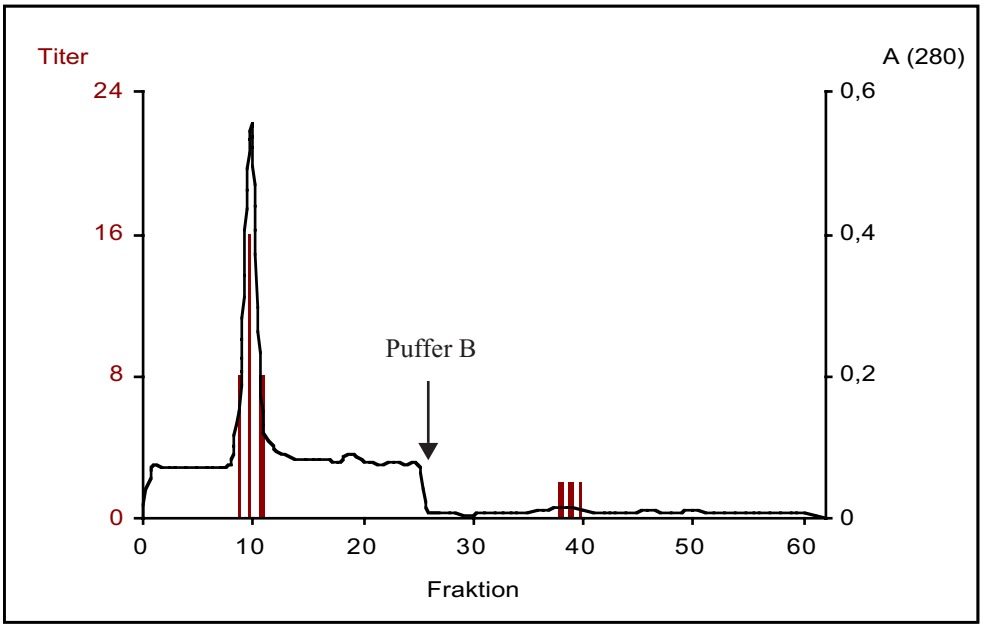
$$I = 0{,}5 \text{ x} \sum_i c_i \text{ x } z_i^2$$

I = Ionenstärke
c_i = Molare Konzentration des Ions
z_i = Ionenladungszahl

Die Ionenstärke des 4.0 M NaCl-Puffers beträgt gemäß dieser Gleichung 4 mol/ l*.

*Berechnung mit oben angegebener Gleichung

Abb. 12: HIC an Phenyl Sepharose HP, Startpuffer 4.0 M NaCl, pH 6.5



Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 1 cm)
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 20 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.433, Titer: 32
Fraktionierung: 1 ml/ min
Puffer A: 4.0 M Natriumchlorid, 0.05 M Imidazol pH 6.5
Puffer B: 0.05 M Imidazol pH 6.5
Pufferwechsel: ab Fraktion 26

Bereits bei Verwendung von Natriumchlorid als Startpuffersubstanz wird ein signifikanter Teil der agglutinierenden Aktivität an die Chromatographiesäule gebunden. Der größte Teil befindet sich allerdings immer noch im Durchlauf.

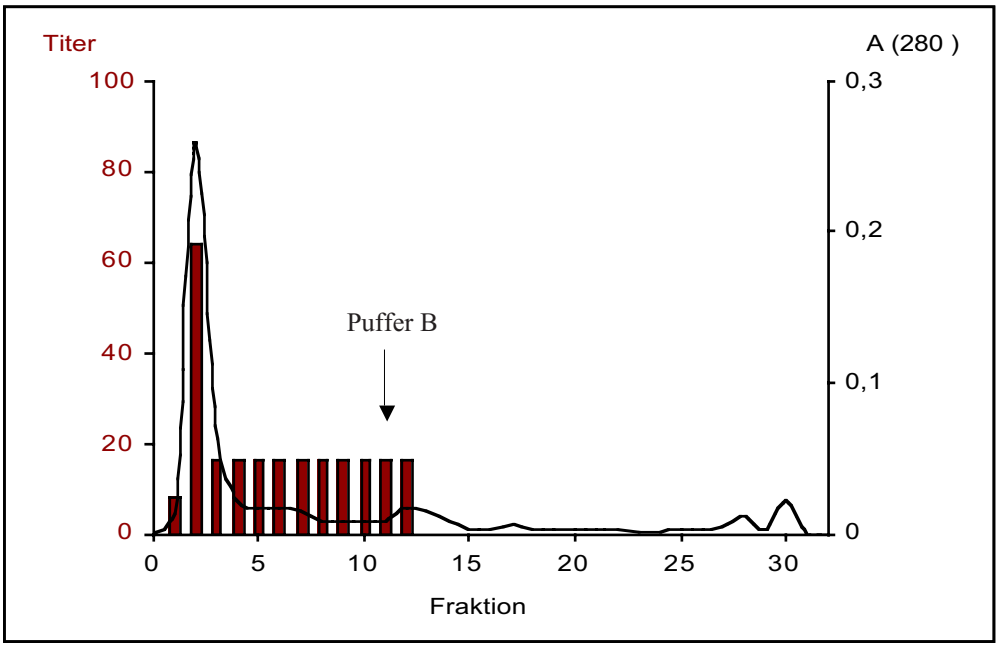
III.3.4.2.2 HIC an Phenyl Sepharose HP, $(NH_4)_2SO_4$ als Startpuffersubstanz

Die Versuche mit Natriumchlorid zeigten, daß eine Erhöhung der Ionenstärke des Startpuffers nötig war, um die Bindung des *Cyperus-esculentus*-Faktors an das Säulenmaterial zu ermöglichen.

In den folgenden Versuchen fand Ammoniumsulfat als Startpuffersubstanz in den Molaritäten von 1.5 - 3.0 M bei verschiedenen pH-Werten Verwendung. Die Abbildungen zeigen die jeweils besten Resultate unter Einsatz der verschiedenen Puffer-Molaritäten.

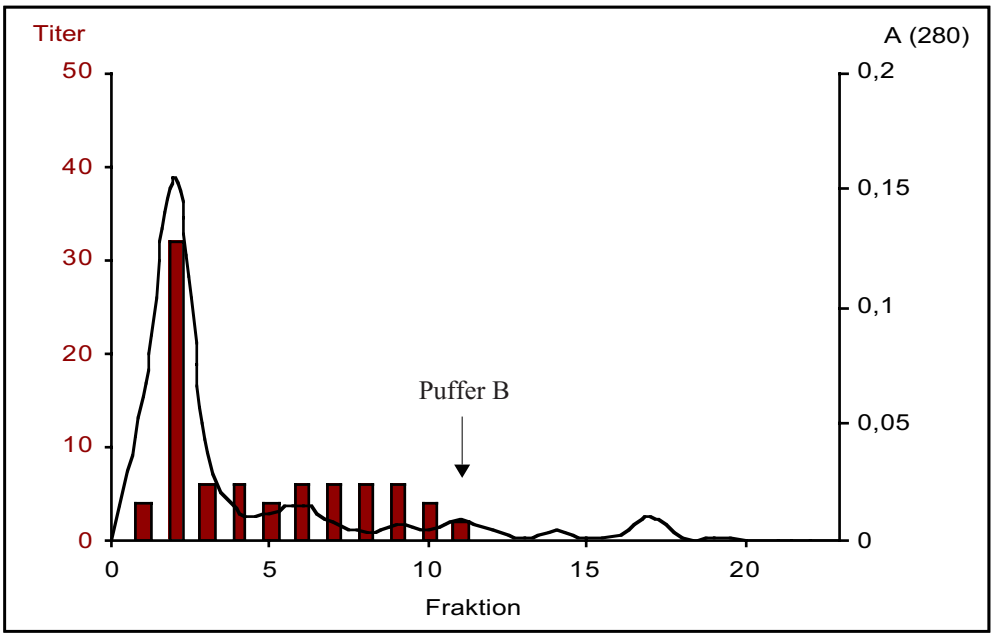
Ein 1.5 M $(NH_4)_2SO_4$-Puffer besitzt eine Ionenstärke von 4.5 mol/ l.

Abb. 13: HIC an Phenyl Sepharose HP, Startpuffer 1.5 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 4.5



Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 1 cm)
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 49 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.433, Titer: 64
Fraktionierung: 1 ml/ min
Puffer A: 1.5 M Ammoniumsulfat pH 4.5
Puffer B: 0.1 M Ammoniumsulfat pH 4.5
Pufferwechsel: ab Fraktion 11

Abb. 14: HIC an Phenyl Sepharose HP, Startpuffer 1.5 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 5.4



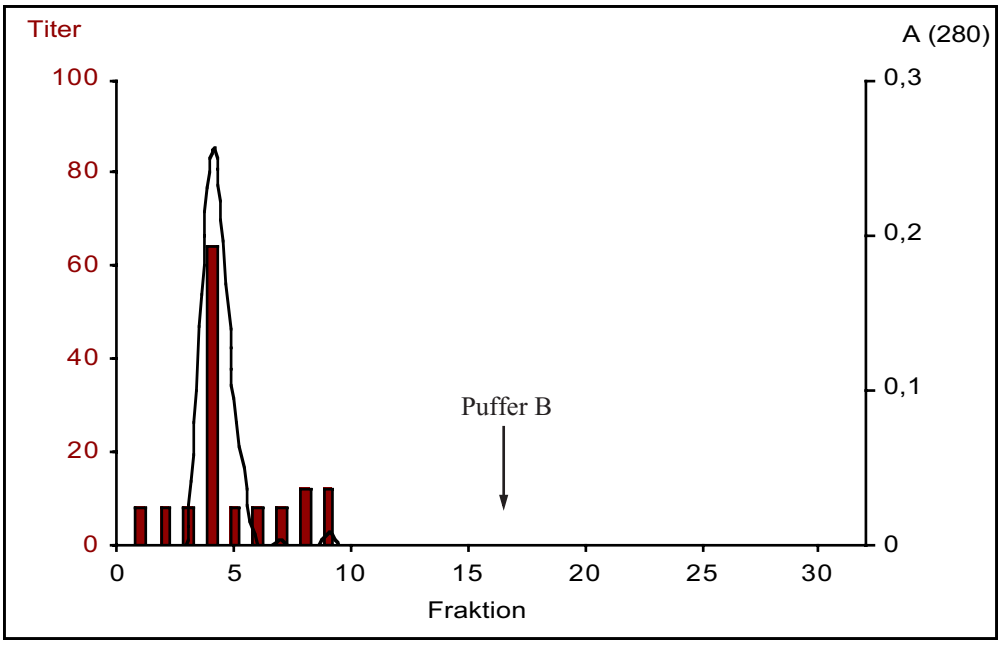
Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 1 cm)
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 49 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.342, Titer: 32
Fraktionierung: 1 ml/ min
Puffer A: 1.5 M Ammoniumsulfat pH 5.4
Puffer B: 0.1 M Ammoniumsulfat pH 5.4
Pufferwechsel: ab Fraktion 11

Selbst bei einer Ionenstärke von 4.5 mol/ l befindet sich noch viel von der agglutinierenden Aktivität im Durchlauf.

Aus diesem Grund war die weitere Erhöhung der Ionenstärke des Startpuffers notwendig.

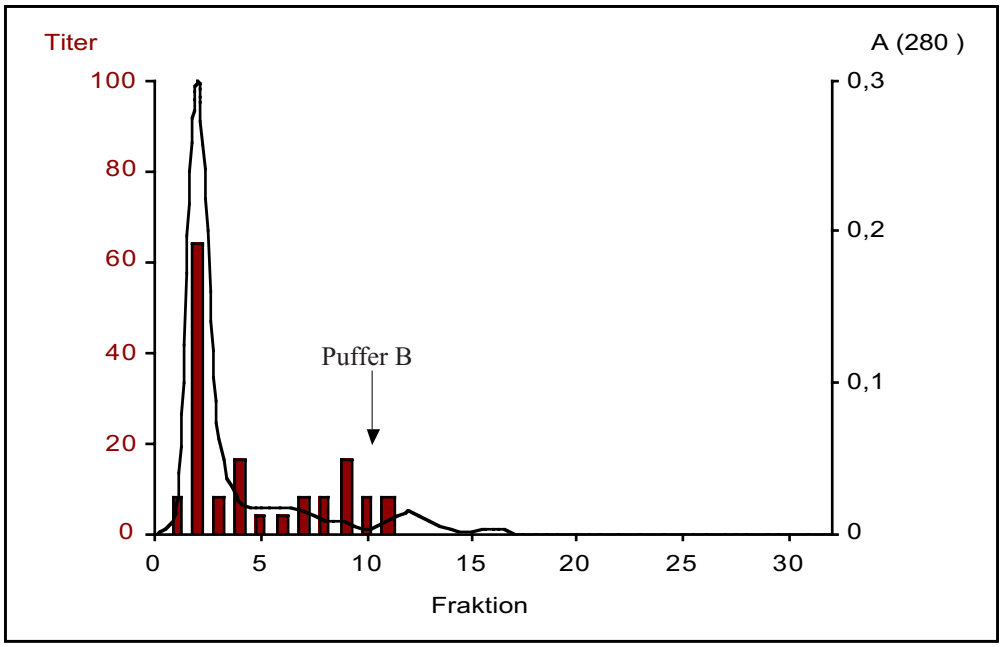
Ein 1.7 M $(NH_4)_2SO_4$-Puffer besitzt eine Ionenstärke von 5.1 mol/ l, ein 2.0 M $(NH_4)_2SO_4$-Puffer weist eine Ionenstärke von 6.0 mol/ l auf.

Abb. 15: HIC an Phenyl Sepharose HP, Startpuffer 1.7 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 4.0



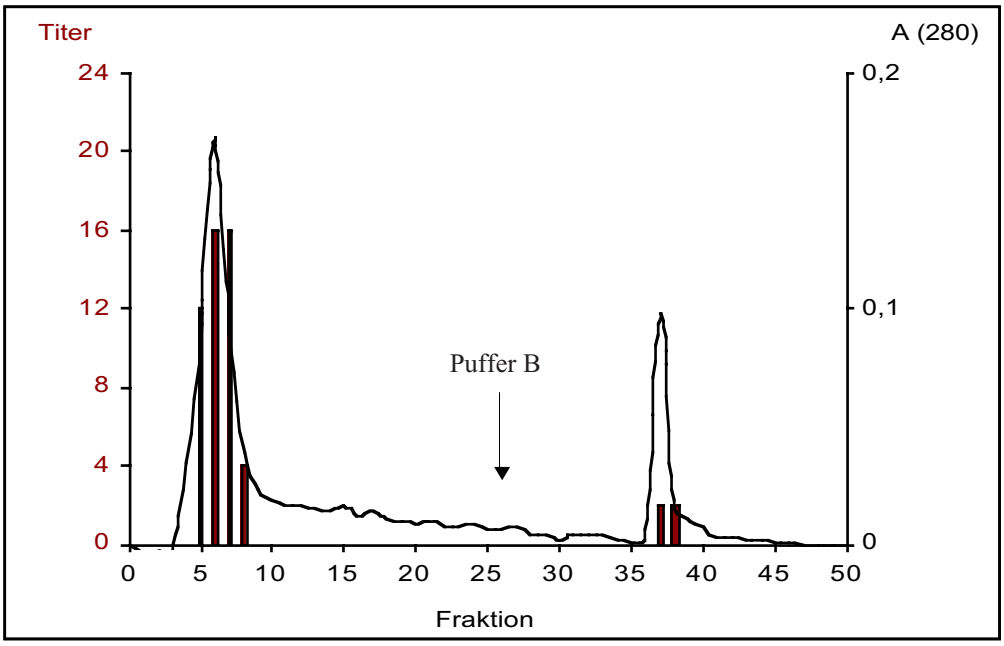
Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 1 cm)
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 49 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.627, Titer 128
Fraktionierung: 1 ml/ min
Puffer A: 1.7 M Ammoniumsulfat, 0.1 M sek. Natriumphosphat pH 4.0
Puffer B: 0.1 M sek. Natriumphosphat pH 4.0
Pufferwechsel: ab Fraktion 17

Abb. 16: HIC an Phenyl Sepharose HP, Startpuffer 1.7 M $(NH_4)_2SO_4$ pH 4.5



Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 1 cm)
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 50 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.581, Titer 128
Fraktionierung: 1 ml/ min
Puffer A: 1.7 M Ammoniumsulfat, 0.05 M sek.. Natriumphosphat pH 4.5
Puffer B: 0.05 M sek. Natriumphosphat pH 4.5
Pufferwechsel: ab Fraktion 11

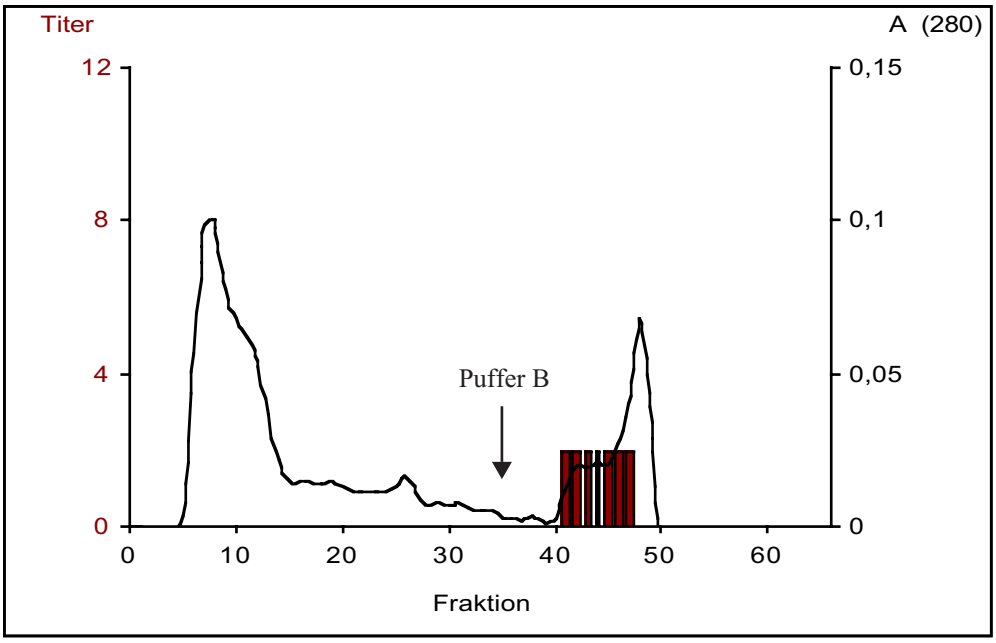
Abb. 17: HIC an Phenyl Sepharose HP, Startpuffer 2.0 M $(NH_4)_2SO_4$



Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 1 cm)
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 24 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.371, Titer: 16
Fraktionierung: 1 ml/ min
Puffer A: 2.0 M Ammoniumsulfat pH 6.5
Puffer B: 0.05 M Imidazol pH 6.5
Pufferwechsel: ab Fraktion 26

Bei einer Konzentration von 2.0 M des Startpuffers (entsprechend einer Ionenstärke von 6.0 mol/ l) bindet bereits ein Teil der aufgetragenen Menge des *Cyperus-esculentus*-Faktors. Aus diesem Grunde war eine weitere Erhöhung der Ionenstärke auf 9 mol/ l (entsprechend einer Molarität von 3.0 M des Startpuffers) erforderlich.

Abb. 18: HIC an Phenyl Sepharose HP, Startpuffer 3.0 M $(NH_4)_2SO_4$



Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 1 cm)
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 20 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.270, Titer: 64-128
Fraktionierung: 1 ml/ min
Puffer A: 3.0 M Ammoniumsulfat pH 4.0
Puffer B: 0.05 M Imidazol pH 4.0
Pufferwechsel: ab Fraktion 35

Die Molarität 3.0 M des Startpuffers (entsprechend einer Ionenstärke von 9 mol/ l) ermöglicht die vollständige Bindung der agglutinierenden Aktivität aus *Cyperus esculentus* an das hydrophobe Medium Phenyl Sepharose HP. Die Wahl des pH-Wertes zwischen 4.0 und 6.5 spielt dabei nicht die entscheidende Rolle, da verschiedene pH-Werte - relativ gesehen zu der Ionenstärke des Startpuffers - keine bedeutende Veränderung des Chromatographieverlaufs bewirken.

III.3.4.3 Übertragung der optimierten Versuchsbedingungen auf einen größeren Maßstab

Es gestaltete sich sehr schwierig, die agglutinierende Aktivität in den Fraktionen wiederzufinden, da hohe Salzkonzentrationen selbst eine Agglutination vortäuschen und daher die eigentliche Agglutination maskieren. Als Maßnahme gegen diese Erscheinung wurden die relevanten Fraktionen durch Ultrafiltration (Centrex UV-0.5 Ultrafilter, cut off 3 kD) entsalzen und erst dann dem Agglutinationstest unterzogen. Die nach 60 - 90 min bei 10.000 RPM erhaltenen Retentate waren

weitgehend salzfrei. Dieses Verfahren erwies sich jedoch als sehr mühsam und zeitintensiv.

Daher wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, die Agglutination besser erkennbar zu machen.

Manche Lectine binden Kohlenhydrate erst in Anwesenheit von Calcium-Ionen bzw. der Zusatz von Calcium-Ionen bewirkt eine Bindungsverstärkung (Calcium-vermittelte Bindung der sog. C-type Lectine). Man könnte dann stärker verdünnte Proben untersuchen, bei denen die Ammoniumsulfat-Konzentration unter die kritische Grenze gesunken wäre. Um die "Wiederfindung" des *Cyperus-esculentus*-Faktors in den Fraktionen der HIC zu erleichtern, wurde nun erneut die Agglutinationskraft von Calcium-Ionen für einen Konzentrationsbereich von 0.1 M - 1.0 M getestet (vgl. III.4.3), allerdings unter Verwendung von $CaCl_2$, da dieses besser löslich ist.

Der Agglutinationstest wurde in einer Mikrotiterplatte durchgeführt (siehe Experimentalteil). Zu 25 µl Erythrozytenpuffer im ersten Napf einer vertikalen Reihe wurden 25 µl $CaCl_2$, Probe oder beides pipettiert und einer Verdünnungsreihe in Zweierpotenzen unterzogen. Als Puffersystem kam Erythrozytenpuffer verschiedenen pH-Wertes zur Anwendung. Die Ergebnisse zeigen die nachfolgenden Tabellen 15 und 16:

Tabelle 15: Erythrozytenpuffer pH 8.0

Ca^{2+}-Ionen-Konzentration	**Probe**	**Puffer**	**Titer**
0.0 M	+	+	32 - 64
0.1 M	-	+	8
0.1 M	+	+	128 - 256
0.1 M	+	-	256
0.5 M	-	+	128
0.5 M	+	+	256
0.5 M	+	-	256
1.0 M	-	+	256
1.0 M	+	+	256
1.0 M	+	-	256

Probe: 22 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung, gelöst in 0.5 ml H_2O

Tabelle 16: Erythrozytenpuffer pH 7.4

Ca^{2+}-Ionen-Konzentration	**Probe** (Titer = 32-64)	**Puffer**	**Titer**
0.0 M	+	+	32 - 64
0.1 M	-	+	0
0.1 M	+	+	256
0.5 M	-	+	0
0.5 M	+	+	256
1.0 M	-	+	0
1.0 M	+	+	256

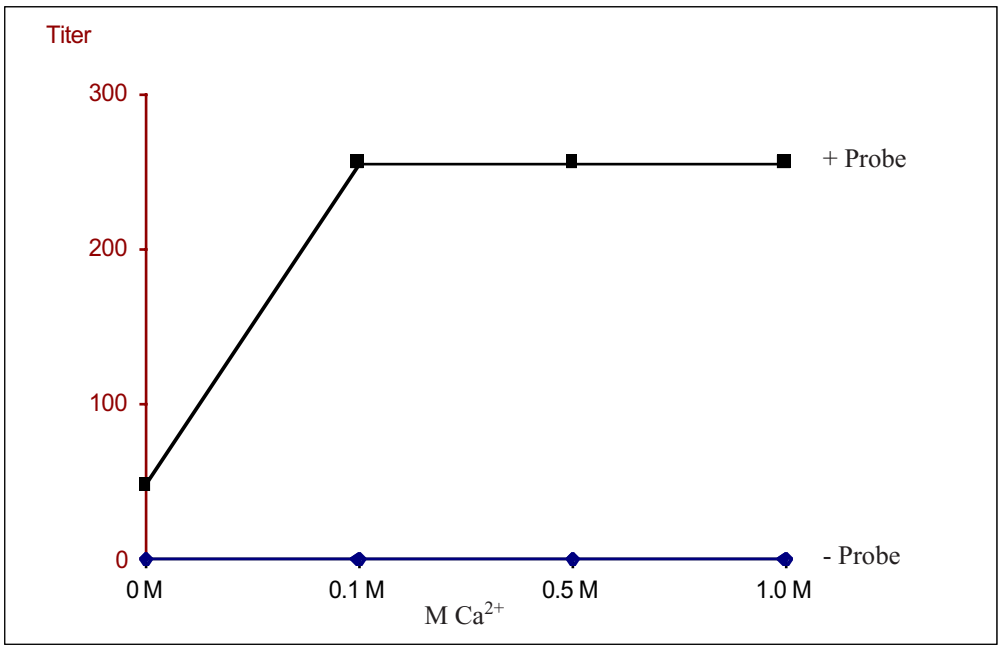
Probe: 22 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung gelöst in 0.5 ml H_2O

Der Zusatz von $CaCl_2$ zum Puffer beziehungsweise zur Probenlösung löste bei einem pH-Wert des Erythrozytenpuffers von 8.0 eine Trübung von $CaCO_3$ aus. Damit verbunden war eine vorgetäuschte Titeraktivität der Ca^{2+}-Ionen, auch ohne Probenzusatz. Diese scheinbare Titeraktivität war beim Einsatz von $CaCl_2$ (siehe Tab. 15) gegenüber $Ca(OAc)_2$ (vgl. III.1.4.3) sogar noch ausgeprägter.

Die Verwendung des Erythrozytenpuffers mit einem pH-Wert von 7.4 zeigt diese Erscheinung nicht, sondern nur eine gleichbleibende Verstärkung des Titerwertes der Probe, ausgelöst ab einem Ca^{2+}-Ionen-Zusatz der Konzentration 0.1 M. Folglich wurde mit diesem Puffersystem pH 7.4, 0.1 M $CaCl_2$ gearbeitet.

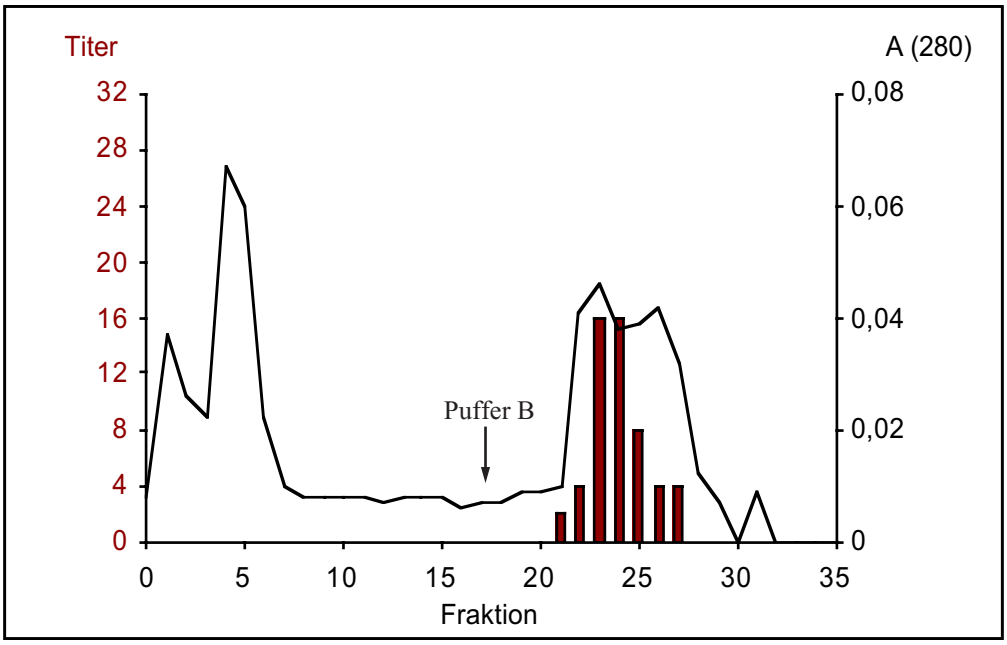
Die folgende Abbildung 19 veranschaulicht dieses Ergebnis nochmals:

Abb. 19: Auswirkung des $CaCl_2$-Zusatzes auf den Titer



Probe: 22 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung gelöst in 0.5 ml H_2O
verwendeter Puffer: Erythozytenpuffer, pH 7.4

Abb. 20: HIC an Phenyl Sepharose HP, Startpuffer 3.0 M $(NH_4)_2SO_4$

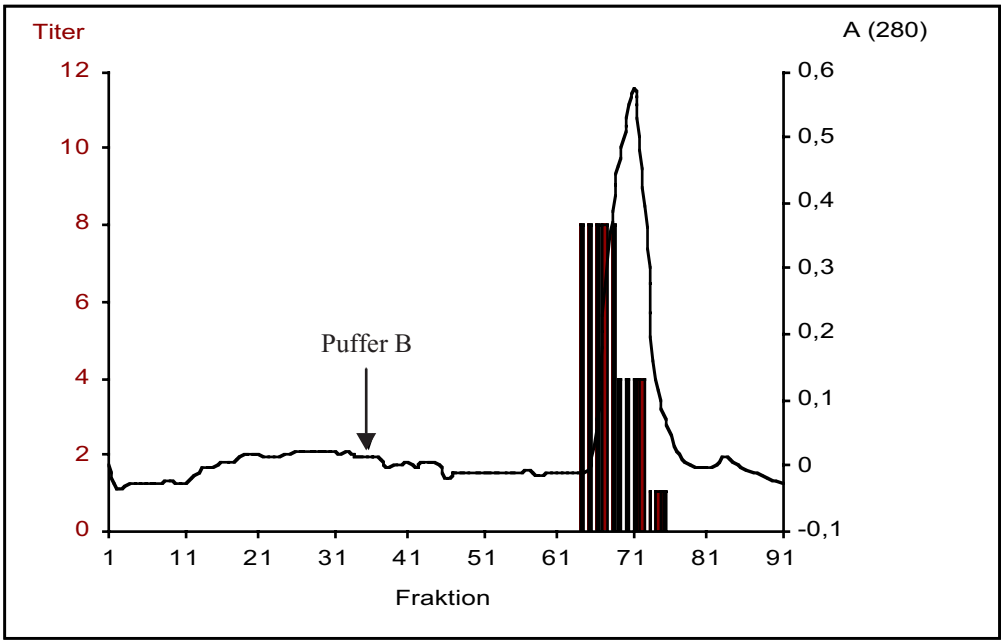


Säule: BIORAD polyprep (0.8 x 4.5 cm)
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 15 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.298, Titer: 64-128
Fraktionierung: 1 ml/ 4 min
Puffer A: 3.0 M Ammoniumsulfat pH 4.0
Puffer B: 0.05 M Imidazol pH 4.0
Pufferwechsel: ab Fraktion 17

Im Unterschied zu Abbildung 18 wurde die Betthöhe der Phenyl Sepharose HP erhöht, sowie die Fraktionszeit bei gleichbleibender Fraktionsgröße verlängert. Die Pufferkonzentrationen und pH-Werte wurden beibehalten. Die agglutinierende Aktivität konnte wie oben ausgeführt unter Verwendung des Erythrozytenpuffers pH 7.4 mit 0.1 M Calcium-Ionen-Zusatz ohne vorherige Entsalzung nachgewiesen werden.

III.3.4.4 Vergrößerung des Säulenmaßstabs

Abb. 21: HIC an Phenyl Sepharose HP, Startpuffer 3.0 M $(NH_4)_2SO_4$



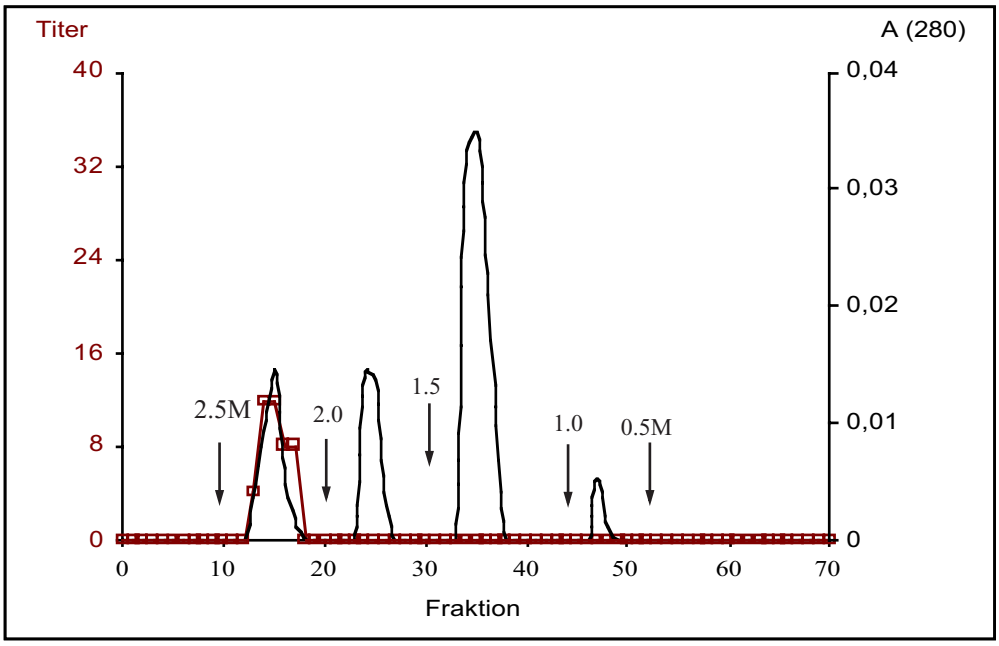
Säule: Durchmesser 1.6 x 10 cm (Volumen 20.11 ml, Betthöhe 10 ml)
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 8 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Puffer A, A (280) = 0.298, Titer: 128-256
Fraktionierung: 1 ml/ 4 min
Puffer A: 3.0 M Ammoniumsulfat, 0.05 M Imidazol pH 4.0
Puffer B: 0.05 M Imidazol pH 4.0
Pufferwechsel: ab Fraktion 39
Pumpe: LKB 2132 Microperpex, Peristaltic Pump (Pumpeneinstellung 05)

Die Vergrößerung des Säulenmaßstabes ergibt eine nahezu Deckungsgleichheit des Elutionspeaks und der titeraktiven Fraktionen mit Abb. 20. Zur Verfeinerung der Elution wurde folgend ein Stufengradient angewendet.

III.3.4.5 Elution unter Anwendung eines Stufengradienten

Zur Optimierung der Elutionsbedingungen wurde ein Stufengradient angewendet. Durch die Anwendung eines Salzgradienten bei der Elution ist eine präzisere Erniedrigung der Salzkonzentration möglich, und damit wird die Leistung der Trennschärfe erhöht.

Abb. 22: HIC an Phenyl Sepharose HP, Startpuffer 3.0 M $(NH_4)_2SO_4$, Stufengradient



Säule: Durchmesser 1.6 cm, Volumen 20.11 ml, Betthöhe 10 ml
Packmaterial: Phenyl Sepharose HP (Pharmacia)
Probe: 7.5 mg Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung in 1 ml Auftragepuffer, A (280) = 0.263, Titer 128
Fraktionierung: 2 ml/ 7 min
Auftragepuffer: 3.0 M Ammoniumsulfat, 0.05 M Imidazol pH 4.0
Alle anderen Puffer 0.05 M Imidazol pH 4.0, Ammoniumsulfatkonzentration wie angegeben.
Pumpe: LKB 2132 Microperpex, Peristaltic Pump (Pumpeneinstellung 05)

Zur Herstellung der Puffer wurden die jeweiligen Mengen an Ammoniumsulfat in 0.05 M Imidazol pH 4.0 gelöst. Auf diese Weise erhält man eine einheitliche Imidazolkonzentration der Puffer und minimiert Absorptionsschwankungen, die durch variierende Imidazolmengen im Puffer auftreten würden.

Die titeraktiven Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Anschließend wurde das Lyophilisat einer Gelfiltration unterzogen. Die vereinigten relevanten Fraktionen nach Gelfiltration, Dialyse und Lyophilisation brachten eine Ausbeute von 0.2 mg.

Der erste Absorptionspeak ist nahezu deckungsgleich mit dem „Titerpeak“. Fremdsubstanzen, die bei 280 nm Absorption aufweisen, werden unter Anwendung eines Stufengradienten nach der agglutinierenden Aktivität mit guter Trennschärfe von der Säule eluiert.

Tabelle 17: Bilanz der HIC unter Anwendung des Stufengradienten

	Lyophi-lisat	**$A_{(280)}$**	**Aggl.-menge**	**Ausbeute (%)**	**Spez. Aktivität**	**Reinigungs-faktor**
vor HIC	7.5 mg	0.263	128	100	487	1
nach HIC	*	0.0071	88	69	12400	25
nach HIC, Gelfiltration und Dialyse	0.2 mg	0.0085	104	81	12250	25

*Die Proteinlösung wurde vor der Gelfiltration und Dialyse nicht lyophilisiert.

Die hydrophobe Interaktionschromatographie ermöglicht eine Anreicherung der agglutinierenden Aktivität um den Reinigungsfaktor 25.
Somit ergibt sich ein Gesamtreinigungsfaktor von 3600 für den *Cyperus-esculentus*-Faktor nach der alkalischen Fällung, Gelfiltration an Sephadex G-10 und hydrophoben Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose HP.
Die hydrophobe Interaktionschromatographie unter Anwendung eines Stufengradienten stellte sich damit als effektivste Reinigungsmethode dar.

III.4 Methoden zur Reinheitsprüfung

Zur Überprüfung der Reinheit der durch zweimalige pH-Fällung mit anschließender Gelfiltration an Sephadex G-25 bzw. Sephadex G-10 isolierten agglutinierenden Substanz wurden verschiedene Elektrophorese-Techniken sowie die HPLC herangezogen.

III.4.1 Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen (native Elektrophorese)

Das Trennprinzip beruht auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Die elektrophoretische Mobilität ist abhängig von der Ladung, Größe und der Form der Proteine. Die Ladung wird beeinflußt vom pH-Wert des Puffers und der Temperatur. In den meisten Fällen werden basische Puffer verwendet, die Proteine sind dann negativ geladen und wandern in Richtung Anode. Die relative elektrophoretische Mobilität wird bestimmt, indem man einen ionischen Farbstoff, z. B. Bromphenolblau, als Standard mitlaufen läßt. Auf diese Technik kann in diesem Fall nicht zurückgegriffen werden, da der Faktor im basischen Milieu ausfällt.

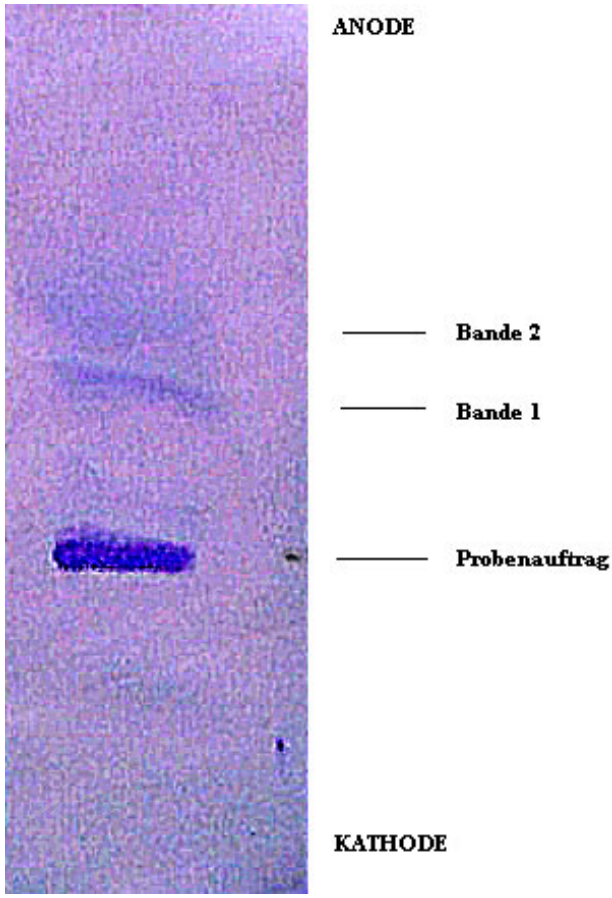
Vorversuche zur Anfärbung

Vor der Durchführung der Elektrophoresen wurde die Anfärbbarkeit der agglutinierenden Aktivität auf einer Kieselgel 60 DC-Alufolie untersucht.
Hierfür wurden definierte Mengen des gelösten *Cyperus-esculentus*-Faktors nach zweimaliger Alkalifällung und Gelfiltration an Sephadex G-10 mit einer Hamiltonspritze punktförmig auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Sprühreagenzien kamen Kaliumpermanganat (1), Ninhydrin (2) und $NaIO_4$/ Tetramethylbenzidin (3) zum Einsatz.
Die Probe erschien als weißer Fleck auf violettem Hintergrund (1). Die Ninhydrinreaktion zum Nachweis von Aminosäuren zeigte nach Erwärmen rote Flecken (2). Mit $NaIO_4$/ Tetramethylbenzidin bilden sich normalerweise weiße Flecken auf blauem Hintergrund. Bei der Durchführung mit der Probe erschienen allerdings grüne Flecken und der Hintergrund färbte sich gelb (3).
Die vorläufige Nachweisgrenze belief sich auf 2.5 µg Probe.

Elektrophorese

Als Trägermaterialien dienten Celluloseacetat-Folien und Polyacrylamidgele. Vorteil der Celluloseacetatmembran ist eine hohe Trennschärfe bei kurzer Laufstrecke. Die Polyacrylamidgele können durch Variation des Acrylamidgehaltes und des Vernetzungsreagenzes mit unterschiedlicher Porengröße hergestellt werden. Dadurch werden die Proteine aufgrund ihrer Ladung und Größe mit hoher Trennleistung aufgetrennt.
Aufgrund der Unlöslichkeit des *Cyperus-esculentus*-Faktors bei hohen pH-Werten (vgl. III.2.5) wurde in saurem Milieu gearbeitet.
Für die Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien wurden verschiedene Puffersysteme angewendet: Ein Eisessig/ Pyridin/ Wasser-Gemisch pH 3.3 (1), ein Glycin/ Tris-Puffer pH 7.3 (2) und ein Glycin/ Tris-Puffer pH 7.0 (3). Die Probe (c = 2 mg in 10 µl H_2O) wurde als schmale strichförmige Zone auf die puffergetränkte Membran aufgebracht.
Für die Folien war keines der oben angeführten Sprühreagenzien das Mittel der Wahl. Das Puffersystem (3) erwies sich als geeignetes Laufmittel. Es brachte zwei Banden in Richtung Anode hervor, die mit Coomassiebrilliantblau R-250 sichtbar gemacht werden konnten. Allerdings war auch die Startzone blau gefärbt, was möglicherweise auf einsetzende Ausfällung des *Cyperus-esculentus*-Faktors zurückzuführen ist. Die gewanderte Front konnte demnach nicht der agglutinierenden Aktivität zugeordnet werden.

Ergebnisse:



Für die Polyacrylamidgelelektrophorese kam die Flachbett-Technik zur Anwendung.
Es wurden Gele mit einer Schichtdicke von 0.75 mm und einer Acrylamidkonzentration von 7.5 % hergestellt. Die Elektrophorese wurde mit einem Alaninpuffer bei pH 4.5 durchgeführt. Als Probe wurden 5 mg des *Cyperus-esculentus*-Faktors in 30 ml des Elektrophoresepuffers gelöst und in die Geltaschen eingebracht.
Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassiebrilliantblau G-250, Coomassiebrilliantblau R-250 und nach verschiedenen Silberfärbemethoden angefärbt.
Mit allen drei Färbereagenzien konnte keine Anfärbung der agglutinierenden Aktivität erzielt werden.

Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

SDS (Abkürzung für *sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladungen von Proteinen so effektiv, daß Micellen mit konstanter negativer

Ladung pro Masseneinheit entstehen. Die Trennung im elektrischen Feld erfolgt im Gegensatz zur oben angeführten nativen Elektrophorese (siehe III.4.1) nur nach der Größe der Proteine. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuß von SDS auf 95 °C erhitzt. So wird die Tertiär- und Sekundärstruktur durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen werden durch die Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, z. B. β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol, aufgespalten. Die mit SDS beladenen, gestreckten Aminosäureketten bilden Ellipsoide.

Vorteile der SDS-Elektrophorese:

Mit SDS gehen auch sehr hydrophobe und denaturierte Proteine in Lösung. Proteinaggregationen werden verhindert, weil die Oberflächen negativ geladen sind. Man erreicht schnelle Trennungen, weil die SDS-Protein-Micellen hohe Ladungen tragen. Alle Proteine wandern in eine Richtung. Die Trennung erfolgt nach einem Parameter, dem Molekulargewicht.

Nachteile der SDS-Elektrophorese:

SDS denaturiert die Proteine, in der Regel sogar irreversibel. Mit nicht-ionischen Detergenzien, die z.B. zur Solubilisierung hydrophober Membranproteine eingesetzt werden, ist es nicht kompatibel.

Ergebnisse:

Die Elektrophorese zeigte sowohl bei einem 2.5 h Lauf als auch bei einem 8 h Lauf zwei Banden in Richtung Anode, die mit Coomassiebrilliantblau R-250 angefärbt werden konnten. Ähnlich wie bei der Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien kann dieses Ergebnis aber keine eindeutige Interpretation der Banden zulassen, da nicht sicher ist, ob es sich bei einer der Banden um die agglutinierende Aktivität handelt.

III.4.2 Kapillarelektrophorese

Unter dem Begriff Kapillarelektrophorese faßt man verschiedene Techniken zusammen. Bei der Kapillarzonenelektrophorese (CZE), die ausschießlich in mit Elektrolyt gefüllten Kapillaren durchgeführt wird, beruht die Trennung auf den Mobilitätsdifferenzen der Proben.

Die Trennung der Proben erfolgt im Trennpuffer innerhalb der Kapillare durch Anlegen einer Spannung (kann bis zu 30.000 Volt betragen) an die Puffergefäße. Das sich in der Kapillare ausbildende elektrische Feld bewirkt die Migration der Probenzonen. Die elektrophoretische Wanderung der Substanzen erfolgt primär durch den elektroosmotischen Fluß (EOF), der aktiv zum Transport der Probenzonen (durch Überlagerung), nicht aber zu ihrer Trennung beiträgt. Der EOF hängt stark vom pH-Wert des Puffers und von den Oberflächeneigenschaften der Kapillare ab. Er kann so groß sein, daß nicht nur neutrale Moleküle bewegt werden, sondern negative Ionen entgegen ihrer elektrophoretischen Migration zum Detektor transportiert werden können.
Nachdem in den Puffern an der Oberfläche von Quarzkapillaren durch Dissoziation von Silanolgruppen negative Ladungen vorliegen, die positive Ladungen in der Nähe der Wand induzieren, geht der EOF in Richtung zur Kathode und hilft damit die Probenzonen zum Detektor zu transportieren, so daß bei ausreichend hohem EOF auch Anionen zur Kathode transportiert werden.

Probenaufgabe:

Die reproduzierbare Probenaufgabe stellt in der CZE ein schwieriges Problem dar, da die Gefahr der Bandenverbreiterung besteht, wenn die Probenzone zu groß ist. Um dies verhindern zu können, müssen sehr kleine Probenvolumina im Bereich von 2 nl bis 20 nl reproduzierbar injiziert werden.
Eine mögliche Injektionsart stellt die hydrodynamische Injektion dar. Hierbei erfogt die Injektion durch Druck bzw. Vakuum, bei einer Mindestprobenmenge von 2.0 ml (Mehrfachinjektion). Die relative Standardabweichung bei dieser Art der Injektion betragen 2 - 3 % (Erfahrungswert).

Detektion:

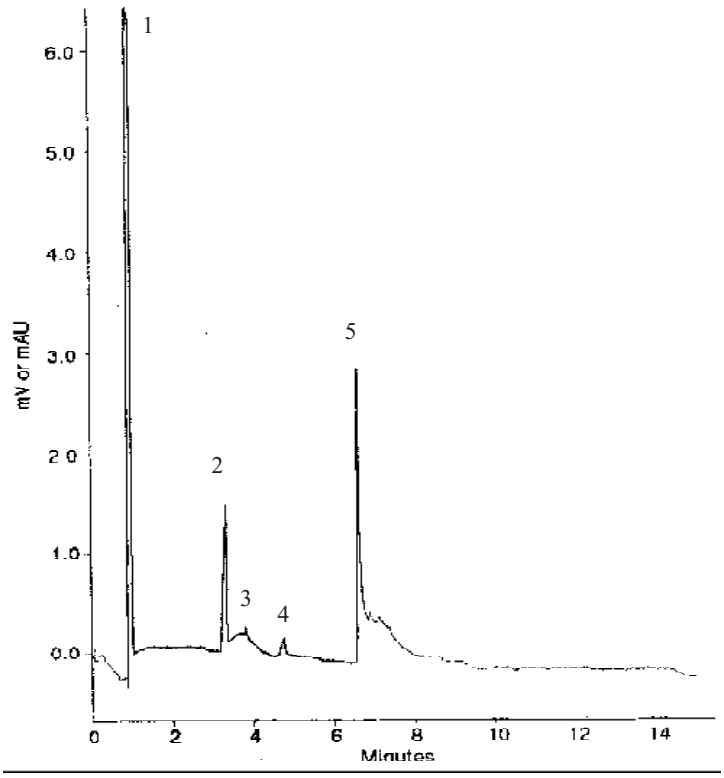
Die Detektion erfolgt in der CZE in den meisten Fällen direkt in der Trennkapillare (online). Die am häufigsten verwendeten Detektoren sind modifizierte HPLC-Detektoren zur Messung der UV-Detektion.
Proben ohne Absorption im UV-Bereich lassen sich mit kommerziellen UV-Detektoren mittels indirekter UV-Detektion empfindlich nachweisen. Man gibt dem Puffer einen Elektrolyten mit UV-Absorption zu, der ähnliche Mobilität besitzt wie die zu trennenden Proben. An der Stelle der Probe muß wegen der erforderlichen Elektroneutralität die Menge des zugesetzten absorbierenden Elektrolyten niedriger sein (Verdrängungsmechanismus), so daß hier der Puffer höhere

Durchlässigkeit besitzt, was sich durch einen negativen Peak bemerkbar macht.

Die Nachweisempfindlichkeit in der indirekten UV-Detektion hängt vom molaren Extinktionskoeffizienten des zugesetzten UV-absorbierenden Hintergrundelektrolyten ab und entspricht der der normalen UV-Detektion. Probleme mit Systempeaks, die den Einsatz der indirekten Detektionstechnik in der HPLC erschwerten, treten in der CE nicht auf, da keine stationäre Phase vorliegt, deren Sorptionsgleichgewicht beim Durchtritt des Lösemittelpfropfens der Probe gestört wird. In der CZE wandert diese Zone mit der Geschwindigkeit des EOFs, während ionische Proben entweder vor oder nach dem EOF migrieren. Kationen wandern bei normal vorliegender Polung (Migration von Anode Richtung Kathode) vor dem EOF, Anionen mit einfacher negativer Ladung nach dem EOF. Bei umgekehrter Polung (Migration von Kathode Richtung Anode) liegen umgekehrte Verhältnisse vor.

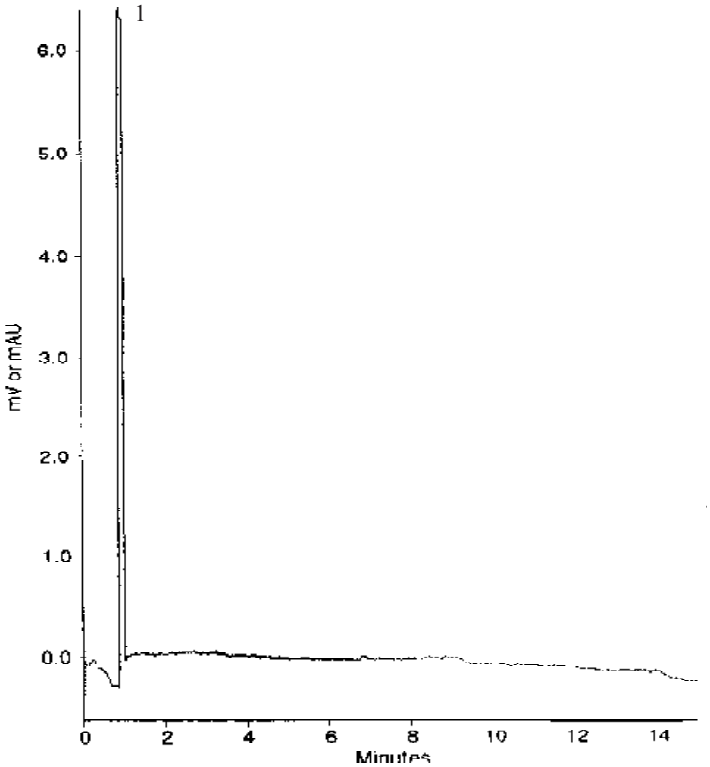
Anhand der Überlegungen, wie man die Anionen (Salze), die sich nach der zweimaligen pH-Fällung und anschließender Gelfiltration an Sephadex G-25 bzw. G-10 noch im *Cyperus-esculentus*-Faktor als Verunreinigungen befinden, nachweisbar machen könnte, wurde die CZE mit hydrodynamischer Injektion und indirekter Detektion als Methode gewählt.

Abb. 23: Elektropherogramm des *Cyperus-esculentus*-Faktors nach alkalischer Fällung und Gelfiltration an Sephadex G-25



Peak 1: Elektroosmotischer Fluß (EOF)
Peak 2: Chlorid
Peak 3: Sulfat
Peak 4: Carbonat
Peak 5: Acetat
System: CE 1000 (Comm Port 1)
Kapillare: 2559
Kapillarenlänge: 42 cm
Durchmesser: 25 µm
Mittlere Spannung: 20.8 kV
Mittlere Stromstärke: 4.2 µA
Detektion: A 217 nm

Abb. 24: Elektropherogramm des *Cyperus-esculentus*-Faktors nach alkalischer Fällung und Gelfiltration an Sephadex G-10



Peak 1: Elektroosmotischer Fluß (EOF)
System: CE 1000 (Comm Port 1)
Kapillare: 2559
Kapillarenlänge: 42 cm
Durchmesser: 25 µm
Mittlere Spannung: 20.8 kV
Mittlere Stromstärke: 4.3 µA
Detektion: A 217 nm

Der *Cyperus-esculentus*-Faktor nach alkalischer Fällung enthält die anorganischen Verunreinigungen Chlorid, Sulfat, Carbonat und Acetat. Diese anorganischen Salze können durch Gelfiltration an Sephadex G-25 nicht abgetrennt werden.

Der *Cyperus-esculentus*-Faktors nach alkalischer Fällung und Gelfiltration an Sephadex G-10 ist dagegen salzfrei, mit dieser Methode allerdings selbst nicht als Peak zu sehen.

III.4.3 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Chromatographie an unpolaren stationären Phasen (Reversed Phase Chromatography RPC)

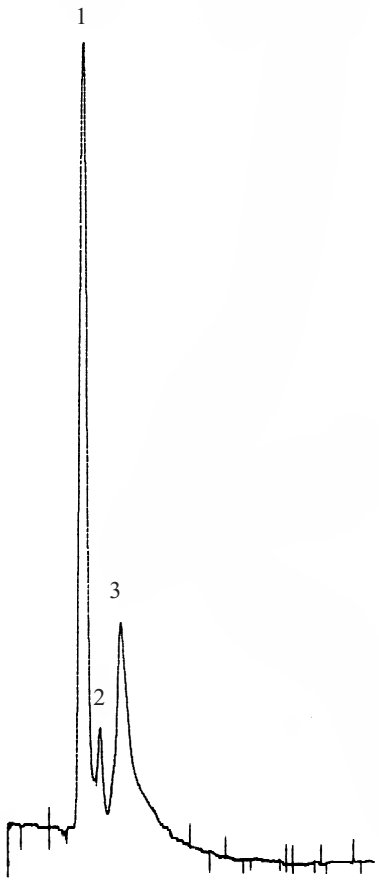
In der RPC werden als Packungsmaterialien silanisierte Kieselgele eingesetzt. Sie enthalten an der Oberfläche chemisch gebundene n-Alkylketten. Am häufigsten werden n-Octadecylgebundene stationäre Phasen benutzt.

Bei gegebener RP-Säule wird die Verzögerung durch die Veränderung der Polarität des Fließmittels reguliert. Dies geschieht im Wesentlichen durch die Veränderung des Wassergehaltes. Mit steigendem Wassergehalt werden die k'-Werte größer.

Sollen in der RPC ionische bzw. ionisierbare Substanzen getrennt werden, ist es notwendig, den pH-Wert des Fließmittels durch Verwendung von Puffern einzustellen. Versäumt man dies, so erhält man nicht reproduzierbare Ergebnisse oder asymmetrische Peaks. Um eine genügende Pufferwirkung zu gewährleisten, sollte die Pufferkonzentration zwischen 10^{-3} und 10^{-2} mol/l liegen.

Zur Trennung der organischen Komponenten wurde die HPLC im Rahmen von Vorversuchen herangezogen. Dabei wurde eine Nucleosil RP-18, 125 x 4 mm Säule verwendet. Als mobile Phase dienten unterschiedliche Mischungen aus Phosphatpuffer und Acetonitril. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Abb. 25: HPLC-Chromatogramm des *Cyperus-esculentus*-Faktors nach alkalischer Fällung und Gelfiltration an Sephadex G-10



Peak 1: Retentionszeit (min) = 1.87, Fläche (%) = 56.455
Peak 2:Retentionszeit (min) = 2.31, Fläche (%) = 7.164
Peak 3:Retentionszeit (min) = 2.83, Fläche (%) = 36.388
Säule: Nucleosil RP-18, 125 x 4 mm
Probe: 0.6 mg Lyophilisat in 1 ml Millipore-Wasser
Fließmittel: 0.1 M Phosphatpuffer/ Acetonitril (4:1; V/V)
Flußrate: 0.5 ml/ min

Das Chromatogramm zeigt 3 Peaks, die nicht basisliniengetrennt sind. Das Lyophilisat nach alkalischer Fällung und Gelfiltration ist also nicht homogen und bedarf weiterer Reinigungsschritte.

IV. Charakterisierung des chitosanbindenden Faktors aus *Cyperus esculentus*

IV.1 Agglutinationsaktivität

In die Erythrozytenmembran sind Glycosphingolipide und Glycoproteine eingelagert. Das menschliche Blutgruppensystem unterscheidet zwischen Blutgruppe A mit α-glycosidischem N-Acetyl-D-galactosamin (GalNAc) als endständiger Monosaccharideinheit, Blutgruppe B mit α-glycosidischer D-Galactose (Gal) und Blutgruppe H(0) mit α-glycosidischer L-Fucose (Fuc) als Determinante[14]. Die endständigen Zuckerstrukturen (Glycocalyx) determinieren die Blutgruppenzugehörigkeit.

Lectine erkennen diese Zucker an den Erythrozytenoberflächen, binden sie und führen auf diese Weise zu einer Vernetzung der Erythrozyten. Diese biologisch auffälligste Eigenschaft der Lectine wird als Agglutination bezeichnet. Oftmals sind Lectine sogar in der Lage, zwischen den menschlichen Blutgruppen zu unterscheiden und sie in unterschiedlicher Stärke zu agglutinieren oder sogar nur für eine bestimmte Blutgruppe oder eine bestimmte Tierart spezifisch zu sein.

Modifizierungen in der Agglutinationsstärke sind unter Umständen durch Variation des pH-Werts oder der Ionenstärke einer Lösung zu beobachten. Diese Einflüsse wurden bereits in den Abschnitten III.1.2.1 und III.1.2.2 behandelt.

Tabelle 18: Titer des *Cyperus-esculentus*-Faktors gegen das humane Blutgruppensystem

Blutgruppe	**A**	**B**	**0**
Titer	32	32	64
spez. Aktivität	244.3	244.3	488.5

A, B, 0: Gewaschene humane Erythrozyten
Titer: Verdünnungsgrad, der gerade noch Agglutination aufweist
spez. Aktivität: Quotient aus Titer und Proteingehalt

Es besteht eine leichte, aber signifikante Präferenz für Erythrozyten der Blutgruppe 0 des humanen Blutgruppensystems. Es handelt sich aber nicht um einen blutgruppenspezifischen Faktor, da für die Identifizierung einer einzelnen Blutgruppe die Präferenz nicht ausreichend ist.

IV.2 Zuckerbindungsspezifität und minimale Hemmkonzentrationen

Vgl. III.1.3.

Der *Cyperus-esculentus*-Faktor bindet nur die einfachen Aminozucker Glucosamin, Mannosamin und Galactosamin, nicht aber deren acetylierte Formen.

Lectine lassen sich nicht nur hinsichtlich ihrer Blutgruppenspezifität einteilen, sondern auch bezüglich ihrer spezifischen Bindungsfähigkeit für bestimmte Zucker. Zu den wichtigsten Gruppen zählen:

Glucose/Mannose-, Mannose-, Galactose-, L-Fucose-, N-Acetyl-D-Glucosamin-, N-Acetyl-D-Galactosamin und komplexere Oligosaccharidstrukturen-bindende Lectine.

Die agglutinierende Aktivität aus *Cyperus esculentus* kann keiner dieser Gruppen zugeordnet werden.

IV.3 Proteinbestimmung über UV-Absorption

Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Methode sind klare Lösungen, da Trübungen in dem verwendeten Wellenlängenbereich zu fehlerhaften Absorptionswerten führen können. Die Methode basiert auf der Absorption der Aminsäuren Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm, so daß bei Proteinen mit einem von der „Norm“ stark abweichenden Verhältnis aromatischer/ aliphatischer Aminosäuren die Methode nur bedingt genutzt werden kann.

Bei einer gemessenen Absorption von 1.0 wird eine Proteinkonzentration von näherungsweise 1 mg/ ml angenommen[66].

Da für die Messung stark verdünnte Lösungen verwendet werden, benötigt man nur wenig Material, das außerdem nicht verlorengeht. Ammoniumsulfat oder andere Salze stören die Bestimmung nicht.

Mit dieser Methode wurde im *Cyperus-esculentus*-Faktor ein Proteinanteil von 4.25 % bestimmt.

IV.4 Aminosäurebestimmung[67]

Zur Bestimmung der im *Cyperus-esculentus*-Faktor vorkommenden Aminosäuren wurde die Dünnschichtchromatographie nach saurer Hydrolyse herangezogen. Der empfindlichste Schritt der Aminosäureanalyse von Peptidbindungen stellt die saure Totalhydrolyse dar. Als Säure wird halbkonzentrierte 6 N Salzsäure verwendet, mit der das Protein 24 h bei 108 °C unter Vakuum hydrolysiert wird. In das Pico-Tag-System der Firma Waters werden hierfür bis zu sieben proteinhaltige Hydrolysegefäße in verschließbaren vakuumdichten Gefäßen direkt in die Salzsäure gestellt und über einen Dreiwegehahn mehrfach abwechselnd mit Vakuum und Stickstoff zur Entfer-

nung von restlichem Sauerstoff behandelt. Das Pico-Tag-Gefäß wird dann unter Vakuum auf 108 °C erhitzt. Das dabei austretende HCl-Gas mit Wasserdampf bewirkt eine schonende Hydrolyse des Proteins. Dennoch werden durch die saure Hydrolyse einige der 20 proteinogenen Aminosäuren ganz oder teilweise zerstört. So hydrolysieren Asparagin und Glutamin quantitativ zu den entsprechenden Säuren. Tryptophan und underivatisiertes Cystein werden nahezu vollständig zerstört. Cystin kann bis zu 30 % verloren gehen. Zum Schutze der Aminosäuren Tyrosin und Histidin wird 1 % Phenol zur Salzsäure zugesetzt.

Zum Abbruch der Hydrolyse wird das Pico-Tag-Gefäß in heißem Zustand geöffnet. Dadurch wird die Kondensation von Flüssigkeiten in den Hydrolysereagenzgläsern beim Abkühlen vermieden. Die Hydrolysegefäße werden dann 30 min im Vakuum über NaOH getrocknet und können anschließend qualitativ durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden.

Als Standard wurden die Aminosäuren Cystein, Carboxymethylcystein, Methionin, Cystin, Leucin, Serin, Prolin, Alanin, Histidin, Arginin, Glutamin, Asparaginsäure, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan aufgetragen.

Die anhand dieses Verfahrens qualitativ erfaßten Aminosäuren sind Arginin, Alanin und Phenylalanin.

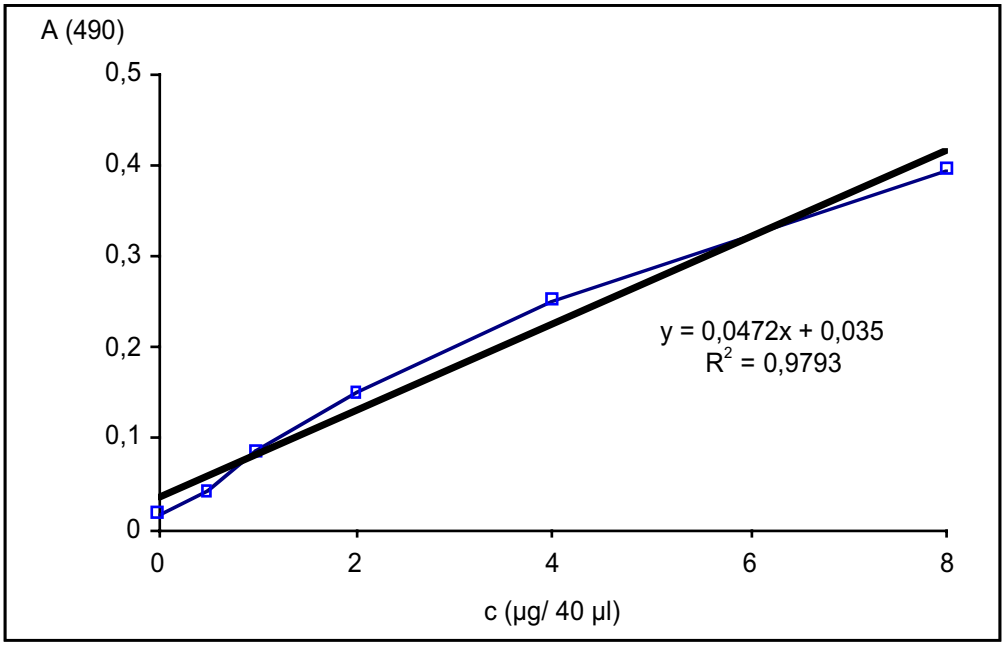
IV.5 Uronsäurenbestimmung

IV.5.1 Quantitative Bestimmung der Uronsäuren mit Hilfe eines Microtiterplatten-Tests[68].

Der Uronsäurengehalt in Glycosaminoglycane oder Pectin enthaltende Proben stellt einen wichtigen Parameter zur quantitativen und strukturellen Analyse dieser komplexen Kohlenhydrate dar. Zur Bestimmung der Uronsäuren werden die Kohlenhydratpolymeren mit 80 % iger Schwefelsäure, die Natriumtetraborat-Ionen enthält, bei 80 °C hydrolysiert und nach Zugabe eines meta-Hydroxydiphenyl-Reagens bei Raumtemperatur kolorimetrisch in Microtiterplatten vermessen.

Als Standard zur Erstellung einer Kalibriergeraden diente Galacturonsäure.

Abb. 26: Bestimmung des Uronsäurengehaltes nach van den Hoogen *et al*.



Probe: 200 µg CEF/ 40 µl
Meßwert: 0.01575 +/- 0.0077
Standard: Galacturonsäure (0 - 8 µg/ 40 µl)
Wellenlänge: 490 nm
Versuchsdurchführung siehe Experimentalteil

Der *Cyperus-esculentus*-Faktor enthält weniger als 0.25 % ± 0.12 % Uronsäuren.

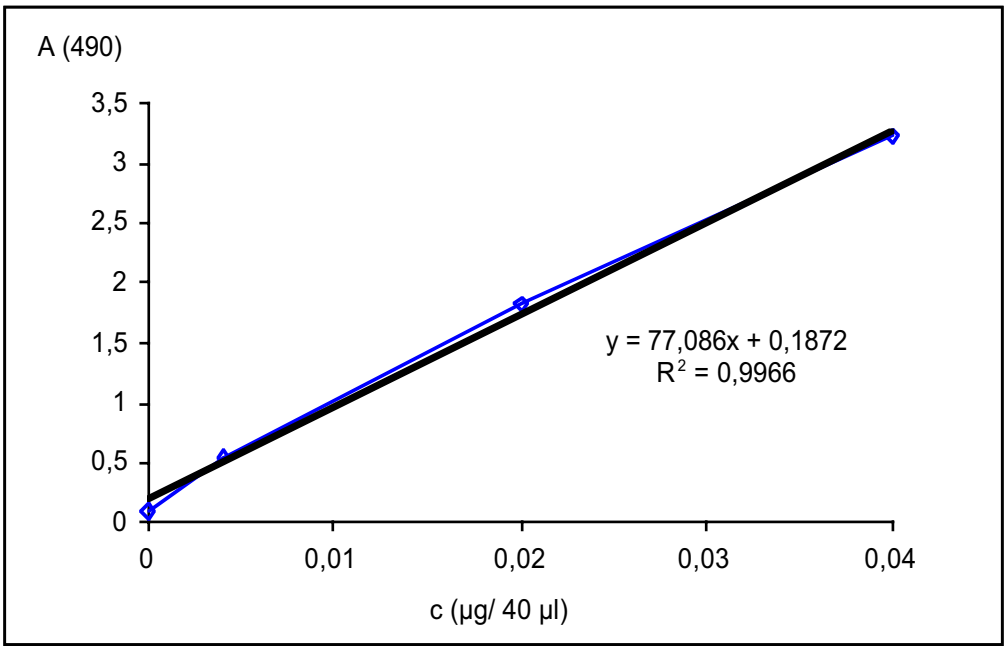
IV.6 Neutralzuckergehalt

IV.6.1 Quantitative Bestimmung des Neutralzuckergehaltes nach Dubois *et al.*[69]

Basis dieser Analysenmethode ist, daß Zucker in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure Furfurale bilden, die mit Phenolen zu Triarylmethanfarbstoffen reagieren können. Diese Chromophore können bei 490 nm spektralphotometrisch quantitativ bestimmt werden.

Zur Kalibrierung wurde Glucose-Monohydrat als Standard verwendet.

Abb. 27: Bestimmung des Neutralzuckergehaltes nach Dubois *et al*.



Probe: 40 µg CEF/ 40 µl
Standard: Glucose-Monohydrat (0 - 0.04 µg/ 40 µl)
Wellenlänge: 490 nm
Versuchsdurchführung siehe Experimentalteil

Der nach dieser Methode ermittelte Neutralzucker-Anteil des *Cyperus-esculentus*-Faktors beläuft sich auf 1.58 % ± 0.32 %.

IV.7 Siliciumbestimmung

Die Arbeit von Heid-Jehn[28] lieferte einen glühbeständigen anorganischen Anteil des *Cyperus-esculentus*-Faktors von 48.7 %. Von diesen 48.7 % wurden 22.4 % als Siliciumdioxid ermittelt. Experimente bezüglich der Hemmwirkung von Siliciumdioxid zeigten, daß die mit SiO_2 behandelten Pflanzen gegen zahlreiche Pflanzenpathogene deutlich resistenter waren als unbehandelte Pflanzen[70]. Die erstaunlich große Menge Siliciumdioxid und deren mögliche antifungale Wirksamkeit veranlaßten uns, die Untersuchungen hinsichtlich des Gehaltes und der Art des Vorkommens des Siliciums fortzuführen.

IV.7.1 Bestimmung des Aschegehaltes (Glührückstandes durch direkte Veraschung).

Durch direkte Veraschung wird der Gesamtmineralstoffgehalt einer Substanz ermittelt. Hierzu wird eine genau abgewogene Menge der zu bestimmenden Probe in einem gewichtskonstant

geglühten Platintiegel bei 600 °C (1 - 3 h) im Muffelofen geglüht. Dieses Prozedere wird wiederholt, bis sich das Gewicht des Tiegels nach Abkühlen in einem Exsikkator nicht mehr verändert. Der prozentuale Glührückstand (Aschegehalt) wird dann durch Differenzwägung unter Berücksichtigung der Einwaage ermittelt.

Tabelle 19: Daten zur Ermittlung des Aschegehaltes

Stadium	**Tiegelgewicht (g)**
vor Konstanttrocknung	6.6272
nach Konstanttrocknung (1 h)	6.6194
nach Konstanttrocknung (2 h)	6.6195
Einwaage *Cyperus-esculentus*-Faktor 300 mg*	6.9195
nach Glühen bei 600°C (6 h)	6.7892
nach Glühen bei 600°C (3 h)	6.7890

*nach zweimaliger Alkalifällung und Gelfiltration an Sephadex G-10

Mit dieser Methode wurde ein mittlerer Aschegehalt von 43.33 % errechnet.

IV.7.2 Gravimetrische Silikatbestimmung

Nach Glühen des Materials bei 550 °C - 800 °C (siehe IV.8.1) wird die entstandene Asche solange mit einem Gemisch aus Flußsäure und konzentrierter Schwefelsäure erhitzt, bis die dabei gebildete Kieselsäure vollständig vertrieben ist und Schwefelsäuredämpfe entweichen[71].
Durch Behandlung der Asche mit Flußsäure entsteht bei Anwesenheit von Silicium flüchtiges SiF_4, gemäß folgender Reaktion:

$$SiO_2 + 4\,HF \longrightarrow SiF_4 \uparrow + 2\,H_2O$$

Durch Differenzwägung unter Berücksichtigung der Einwaage wird anschließend der unlösliche Anteil bestimmt. Aus dem Gewichtsverlust des Platintiegels nach dem Abrauchen mit Flußsäure und anschließendem Glühen bei 600 °C im Muffelofen bis zur Gewichtskonstanz kann der prozentuale Siliciumanteil berechnet werden.

Tabelle 20: Daten zur gravimetrischen Silikatbestimmung

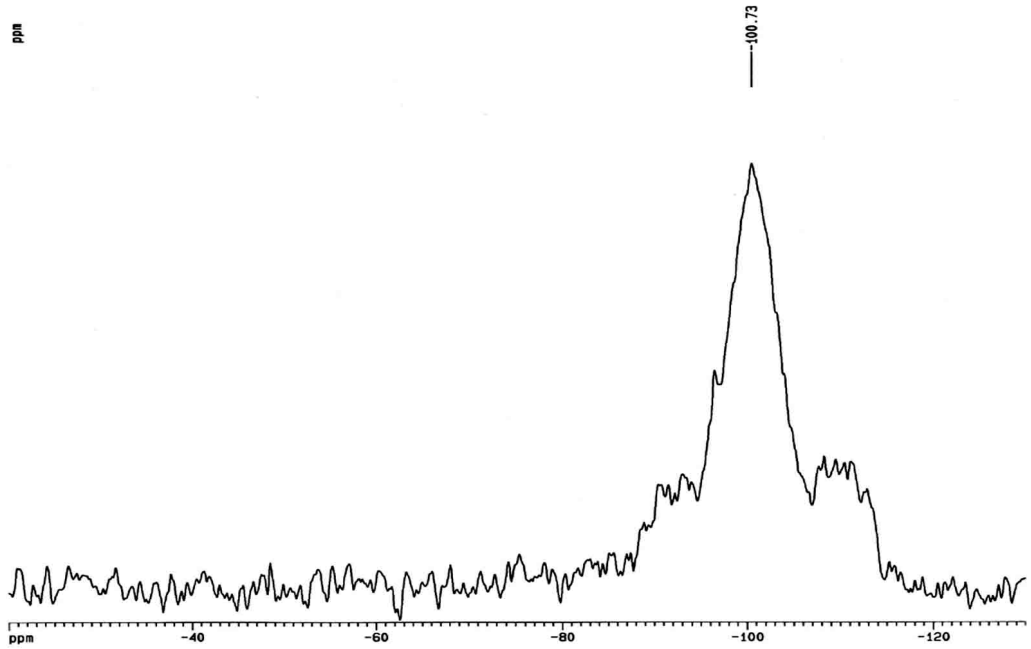
Stadium	Tiegelgewicht (g)
vor Flußsäureaufschluß	6.7891
nach Flußsäureaufschluß u. Trocknung (1 h)	6.7860
nach Flußsäureaufschluß u. Trocknung (3.5 h)	6.7821

Es wurde ein prozentualer Siliciumanteil in Höhe von 5.3 % erhalten.

IV.7.3 Silicium-Bestimmung mittels ^{29}Si CP MAS NMR-Spektroskopie

Als weitere Nachweismethode für die Anwesenheit von Silicium sowie für die strukturelle Charakterisierung dient die hochauflösende Feststoff-^{29}Si NMR-Spektroskopie. Die besten Resultate liefern Feststoff-^{29}Si NMR-Studien unter Anwendung von MAS (Magic-Angle Spinning) zur Reduktion des Signal/ Rausch-Verhältnisses des Spektrums in Kombination mit CP (Cross-Polarization) zur Erhöhung der Peak-Intensitäten.

Abb. 28: ^{29}Si NMR-Spektrum



Die ^{29}Si MAS NMR-Spektroskopie kann klar zwischen den verschiedenen Si Koordinationszahlen unterscheiden. Dies führt zu großen Unterschieden der chemischen Verschiebung im ^{29}Si. Während δ–Werte zwischen -60 und -120 ppm typisch für die Koordinationszahl vier (SiO_4) in Silikaten steht, erscheinen die Resonanzen der oktaedrischen SiO_6-Koordinationen im Bereich zwischen -170 und -220 ppm. Schwache Signale bei -150 ppm werden SiO_5-Verbindungen zugewiesen. Zusätzlich ist der chemische Shift im ^{29}Si empfindlich von der Art und Struktur des ersten und zweiten unmittelbar benachbarten Atoms am Silicium-Atom abhängig. Aus dem ^{29}Si NMR-Spektrum können daher detaillierte Informationen über die direkte atomare Umgebung am Si-Atom erhalten werden.

Die nachfolgende Abbildung faßt die δ–Bereiche die für verschiedene $SiX_{4-n}Y_n$ Koordinationen mit X, Y = O, N, Si und C in festen Materialien wie beispielsweise Silikaten zusammen:

Abb. 29: Bereiche der chemischen Verschiebung im ^{29}Si für $SiX_{4-n}Y_n$ Koordinationen mit X, Y = O, N, Si und C

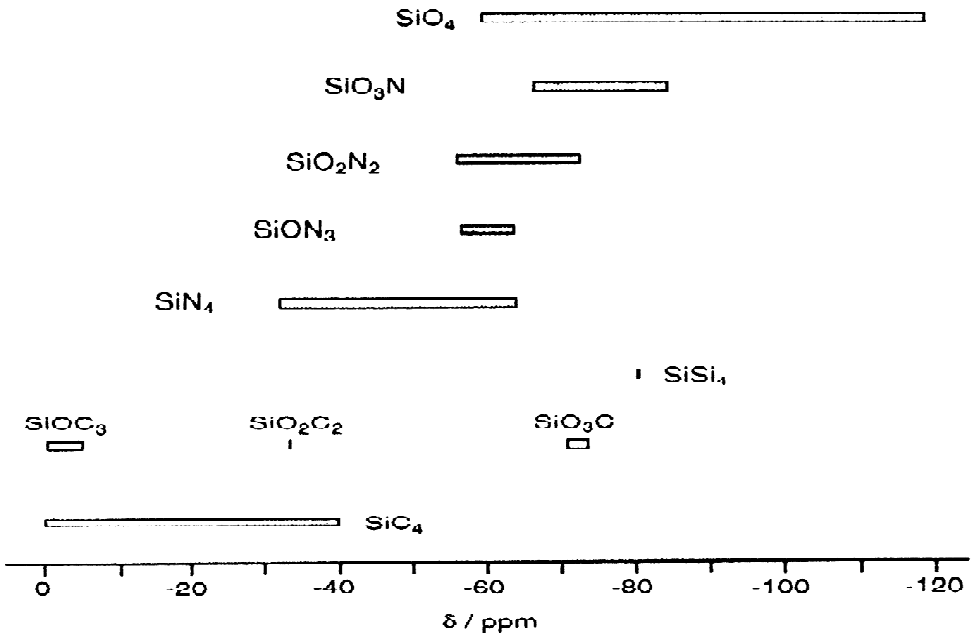


Abbildung aus [72]

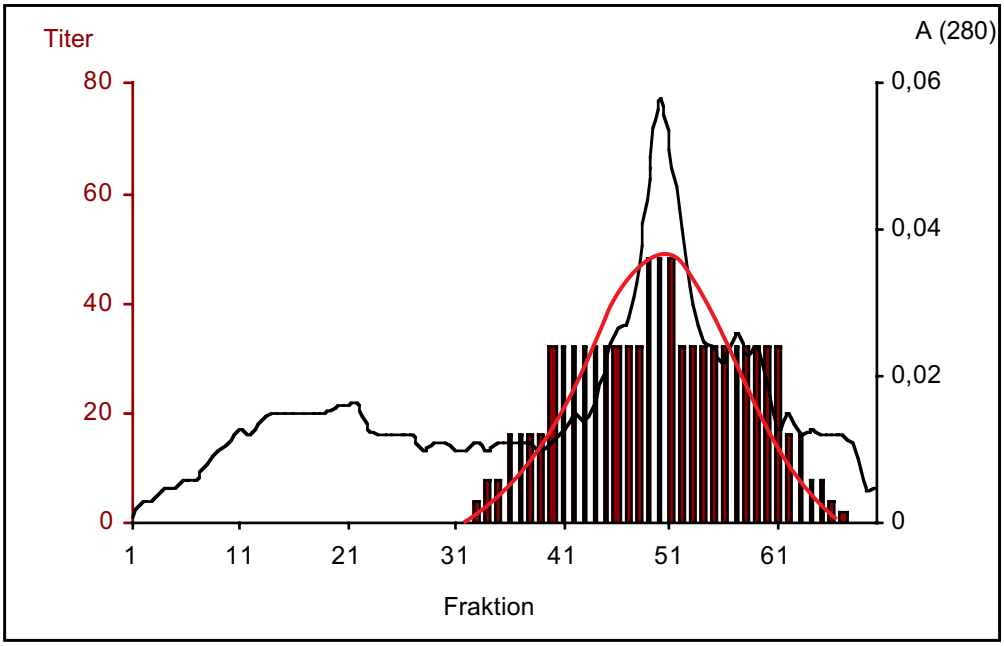
Betrachtet man das ^{29}Si CP MAS NMR-Spektrum des *Cyperus-esculentus*-Faktors anhand dieser Informationen, so kann man für das enthaltene Silicium die Koordinationszahl vier annehmen mit benachbarten Sauerstoff-Atomen.

Die unabhängigen Messungen von drei verschiedenen Chargen lieferten dieses Resultat allerdings nur in einem Fall. Davon ausgehend liegt die Vermutung nahe, daß der Silicium-Gehalt im *Cyperus-esculentus*-Faktor chargenabhängig sein muß.

IV.8 Molekulargewichtsbestimmung

Zur Abschätzung des Molekulargewichts kann die Gelfiltration (Ausschlußchromatographie) angewendet werden. Die Gele wirken als Molekularsiebe, die die Proteine je nach ihrer Größe unterschiedlich lange in den Gelporen zurückhalten, was sich in unterschiedlichen Elutionsvolumina äußert. Für die notwendige Kalibrierung der Ausschluß-Säule sollte man Referenz-Substanzen mit größerem und kleinerem Molekulargewicht wählen und für die Auswertung nur den linearen Bereich der Kalibrierkurve heranziehen.

Abb. 30: Gelfiltration des *Cyperus-esculentus*-Faktors an Sephadex G-50



Trennsäule: Sephadex G-50 (1 cm x 57 cm)
Probe: 5 mg CEF/ 500 µl H_2O, pH 4
Elutionsmittel: H_2O, pH 4
Flußrate: 1.0 ml/ 4.6 min
Fraktionsgröße: 1.0 ml

Abb. 31: Kalibriergerade zur Ermittlung des Molekulargewichtes mittels Gelfiltration

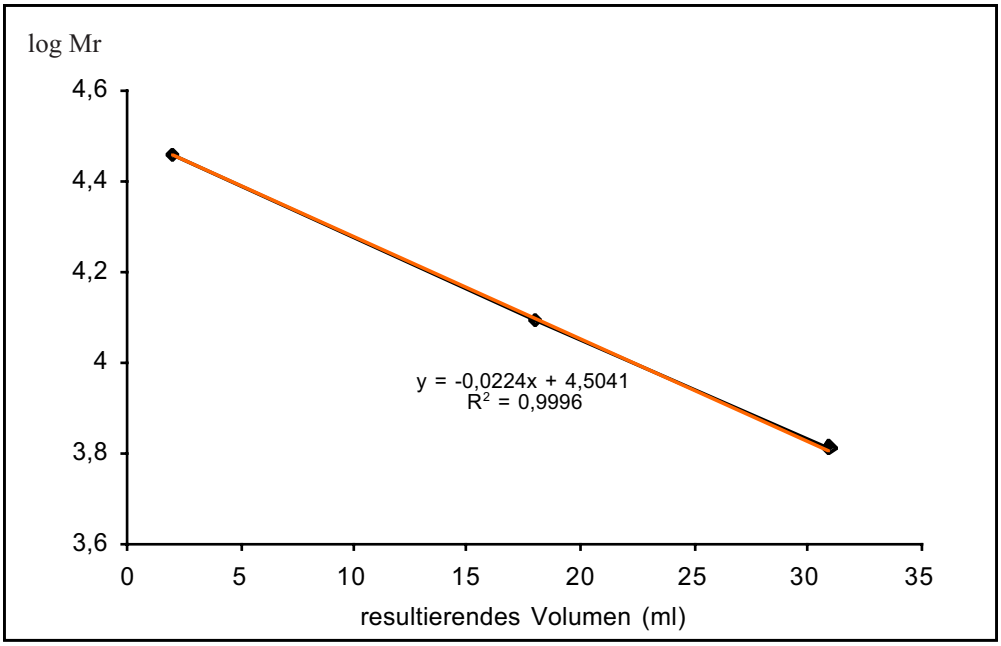


Tabelle 21: Daten zur Kalibrierung und Ermittlung des Molekulargewichtes

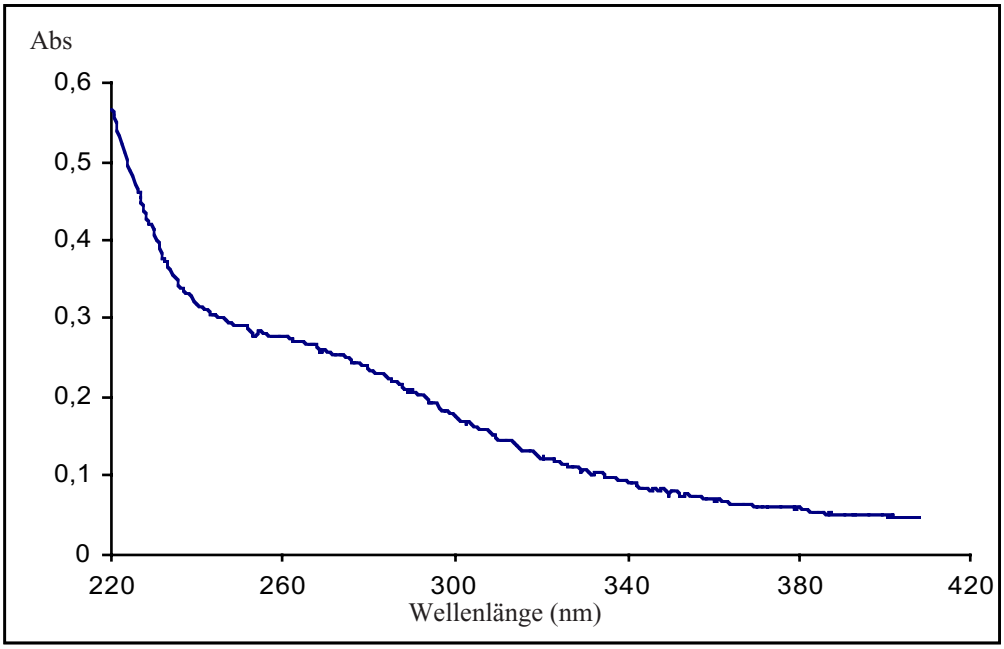
Substanz	Ausschluß-volumen (ml)	Peak-Maximum (ml)	result. Volumen (ml)	Mr	log (Mr)
Carboanhydrase	28	30	2	29000	4.462
Cytochrom C	28	46	18	12400	4.093
Aprotinin	28	59	31	6500	3.813
Cyperus-esculentus-Faktor	28	50	20	11376	4.056

Zur Berechnung des Molekulargewichtes des *Cyperus-esculentus*-Faktors wuden die Titer-Werte nach einer Gauss-Kurve approximiert. Das Peakmaximum liegt bei Fraktion 50. Für die daraus resultierende Halbwertsbreite wurden 20 ml ermittelt.

Für den *Cyperus-esculentus*-Faktor konnte somit ein Molekulargewicht von 11376 ± 1000 Da Fehlerbreite ermittelt werden.

IV.9 UV-Absorptionsspektrum

Abb. 32: Absorptionsspektrum *Cyperus-esculentus*-Faktors



Peak Pick

Nr.	Wellenlänge (nm)	Abs
1	260.00	0.277 Maximum

Punkt Pick

Nr.	Wellenlänge (nm)	Abs
1	280.00	0.236

Im Bereich von 320 - 220 nm zeigt der *Cyperus-esculentus*-Faktor eine Schulter bei einer Wellenlänge von 260.00 nm. Der Extinktionskoeffizient $\varepsilon^{1\%} = 0.173$ wurde berechnet aus der gemessenen Absorption des Maximums und der Einwaage des Faktors.

Tabelle 22: Extinktionskoeffizient $\varepsilon^{1\%}$ des *Cyperus-esculentus*-Faktors

Einwaage	A_{260}	A_{280}	$\varepsilon^{1\%}$(260 nm)	$\varepsilon^{1\%}$(280 nm)
16 mg	0.277	0.236	0.173	0.148

Der Wert des Extinktionskoeffizienten $\varepsilon^{1\%}$ für den *Cyperus-esculentus*-Faktor liegt weit unter bislang bekannten Extinktionskoeffizienten von Lectinen, die in der Größenordnung von 10 - 16 liegen.

V. Biologische Aktivität des *Cyperus-esculentus*-Faktors gegen pathogenen Pilzbefall

Da Pflanzen über kein Immunsystem verfügen, haben sie im Verlauf der Evolution eine Vielzahl anderer wirkungsvoller Verteidigungsstrategien entwickelt. Diese schließen die Synthese von Proteinen und Peptiden mit antifungaler Wirkung ein, welche konstitutiv vorhanden sein können oder auf einen äußeren Reiz („fungale Attacke“) hin gebildet werden.

Einige physiologische Studien über die Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen beweisen, daß die Erkennung eines Elicitors die initiale Signalquelle zur Aktivierung von Verteidigungsreaktionen darstellt[73]. Elicitoren können Oligosaccharide, Glycopeptide/ -proteine, Peptide/Proteine und/ oder Lipide sein, die aus dem Pathogen oder dem Wirt selbst stammen und vielfältige Verteidigungsmechanismen im Wirt auslösen[74]. Die Wahrnehmung eines Elicitors aktiviert zunächst den Ca^{2+}- Einstrom gegen den Austausch von K^+/H^+- Ionen an der Plasmamembran der Zellen. Diese raschen Veränderungen des Ionenflusses zieht den sogenannten „Oxidativen Burst“[75] sowie eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Proteinen nach sich[76]. Diese frühen Ereignisse setzen einen Signalweg in Kraft, der zur Aktivierung der Transkription von Genen führt, welche gegen Pathogene wirksame Proteine exprimieren.

Zu den bekanntesten antifungal wirksamen Proteinen zählen die PR Proteine (pathogenesis-related proteins), die aufgrund eines Pilzbefalls oder einer Virusinfektion die Bildung niedermolekularer antimikrobieller Substanzen, den sogenannten Phytoalexinen, antimikrobiellen Peptiden und kleinen Proteinen induzieren oder eine Reihe antimikrobieller Proteine hochregulieren.

Eine weitere Gruppe antifungaler Cystein-reicher Proteine bilden die Defensine, deren Aminosäurenanzahl zwischen 45 und 54 liegt, die eine positive Ladung besitzen und in den meisten Fällen über vier Disulfid-Brücken verfügen, die das Protein in Lösung stabilisieren.

Die Cyclophiline sind die intrazellulären Rezeptoren für Cyclosporine, einer ebenfalls immunsuppressiv, entzündungshemmend, antifungal und antiparasitär wirksamen Substanzklasse, deren bedeutendster Vertreter das Cyclosporin A (CsA) darstellt, das erstmals 1986 aus dem Pilz *Tolypocladium niveum* isoliert wurde. Bei Pflanzen kommen die Cyclophiline im Cytosol vor. Sie konnten durch die immunsuppressiven Effekte des Cyclosporins A auf nach innen gerichtete K^+-Kanäle und auf die biochemische Analyse bei *Vicia faba L.* belegt werden[77].

Die sogenannten RIPs (ribosomen-inaktivierende Proteine) sind RNA-N-Glycosidasen, welche Purine aus der rRNA abspalten, was naturgemäß zu einem Verlust der Proteinsynthese und damit

zum Zelltod führt.
Zu den Proteaseinhibitoren zählen die Serinprotease- und die Cysteinprotease-Inhibitoren. Diese Proteine hemmen die Aktivität der Enzyme, wodurch das Wachstum von Insekten und Pilzen unterbunden wird.
Antifungale Proteine und Peptide sind aus diversen Gruppen von Organismen wie Pflanzen, Pilzen, Bakterien, Insekten und Tieren isoliert worden. Die Wirkmechanismen dieser Proteine variieren sehr stark und umfassen den Abbau des Zellwandpolymers Chitin aus Pilzen, die Bildung von Membrankanälen und -poren, Schädigung zellulärer Ribosomen, Inhibition der DNA Synthese und des Zellzyklus. Die Art der Wirkungsweise bleibt für viele Proteine bislang unbekannt und bildet die Grundlage der aktiven Forschung.

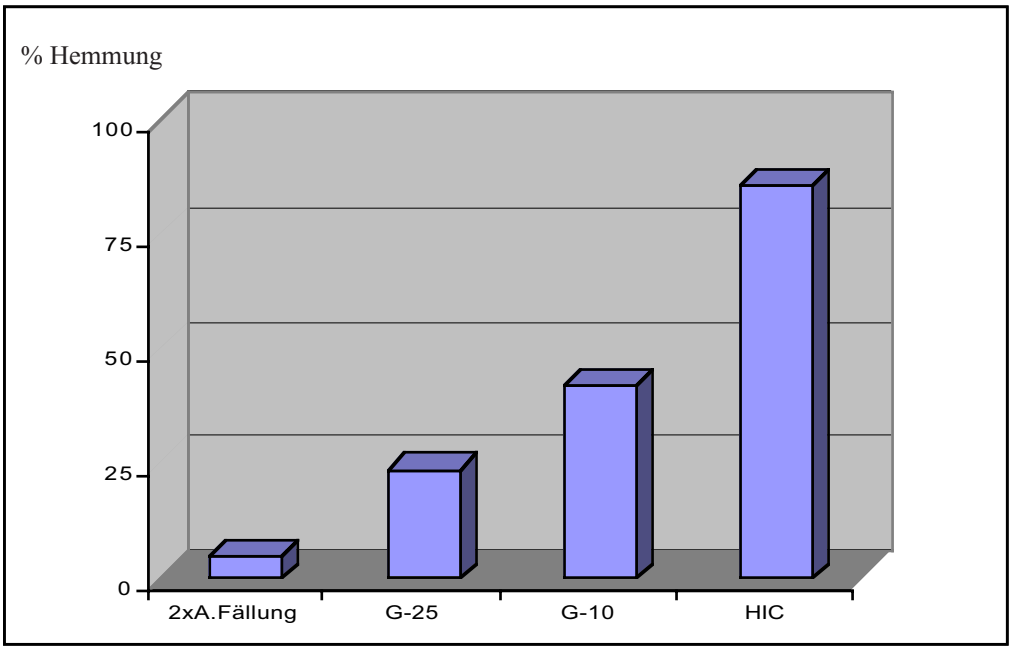
Die folgenden Versuche dienten der Untersuchung der Hemmwirkung des *Cyperus-esculentus*-Faktors auf verschiedene pflanzenpathogene Pilzstämme (*Fusarium moniliformis, Fusarium solani f. pisi* und *Fusarium culmorum*) sowie als Kontrolle auf den humanpathogenen Erreger *Candida albicans*.

Diese potentielle Hemmwirkung des *Cyperus-esculentus*-Faktors wurde mittels einer photometrischen Auswertung im Mikrotiterplattentest überprüft. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, daß das Pilzwachstum eine Trübung der Lösung verursacht, deren Zunahme durch photometrische Absorptionsmessung bei 492 nm bestimmt werden kann.
Methode und Versuchsbedingungen entsprechen einer Kombination der Angaben von Ludwig & Boller (1990)[78], Brockaert *et al.* (1990)[79], Cammue *et al.* (1992)[80], Torres-Londoño (1995)[81] und Heid-Jehn (1997)[28].

V.1 Bestimmung der antifungalen Wirkung des *Cyperus-esculentus*-Faktors gegen *Fusarium moniliformis*

Fusarium-Pilze können Getreideernte-Erträge reduzieren und mit Mykotoxinen kontaminieren. Dies kann bei Mensch und Tier akute oder chronische Krankheiten nach Verzehr des kontaminierten Getreides verursachen.
Der Einsatz des *Cyperus-esculentus*-Faktors in verschiedenen Reinigungsstufen sollte eine mögliche Potenzierung der Wirksamkeit mit zunehmendem Reinheitsgrad nachvollziehen lassen.
Für den Pflanzenparasiten *Fusarium moniliformis* wurden nach 17 h Inkubation unter Einsatz von 0.1 mg/ ml der jeweiligen Reinigungsstufe folgendes Ergebnis erhalten:

Abb. 33: % Hemmwirkung auf das Wachstum von *Fusarium moniliformis* nach 17 h Inkubation in Abhängigkeit von der Reinigungsstufe des *Cyperus-esculentus*-Faktors (100 µg/ ml).



100 % Wachstum = [0 % Hemmung: entspricht der A (492) der 0-Kontrolle (ohne Zusatz der agglutinierenden Aktivität)].
2xA. Fällung = Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung
G-25 = Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung und Gelfiltration an Sephadex G-25
G-10 = Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung und Gelfiltration an Sephadex G-10
HIC = Lyophilisat nach zweimaliger Alkalifällung und Hydroph. Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose HP, Gelfiltration an Sephadex G-10 und Dialyse

Die verschiedenen Reinigungsstufen zeigten erwartungsgemäß unterschiedlich starke Hemmwirkung:

Der *Cyperus-esculentus*-Faktor nach zweimaliger Alkalisierung hemmte das Wachstum von *Fusarium moniliformis* nach 17 h Inkubation um 5 %.

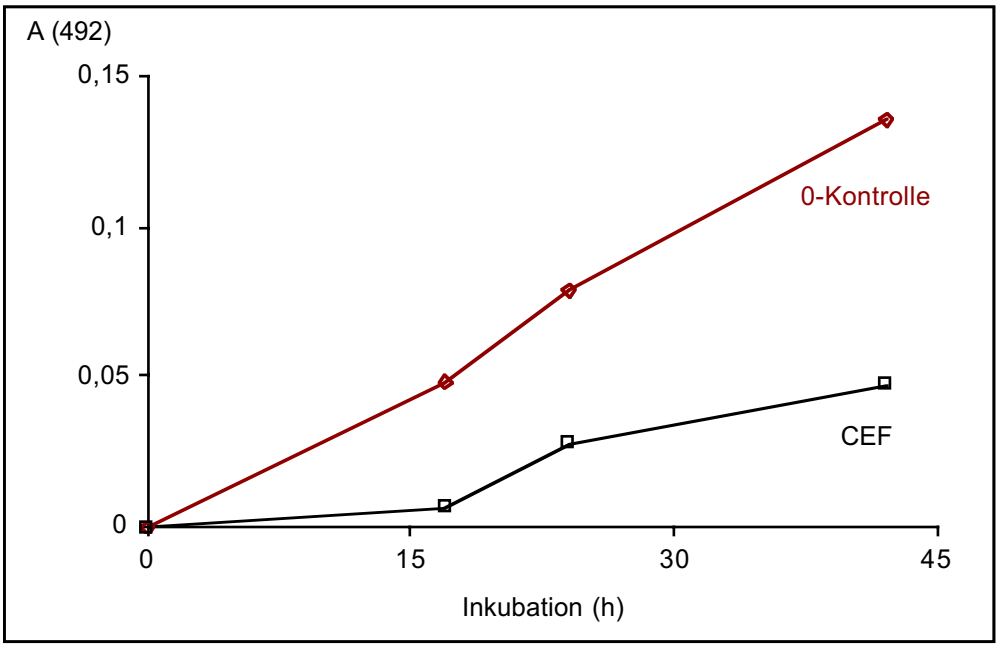
Die aggl. Aktivität nach Gelfiltration an Sephadex G-25 zeigte zu diesem Zeitpunkt eine Hemmwirkung von 24 %.

Höhere Mengen der Präparate dieser beiden Reinigungsstufen hemmten das Wachstum nicht, sondern lieferten sogar höhere Absorptionswerte bei 492 nm als die Kontrolle. Dies ist wahrscheinlich auf den höheren Salzgehalt und dem damit verbundenen antagonistischen Effekt auf die Hemmwirkung zurückzuführen. Ähnliche Ergebisse wurden bereits von Cammue *et al.*[80] und meinen Vorgängerinnen C. Heid-Jehn[28] und P. Torres-Londoño[81] erzielt.

Nach Gelfiltration an Sephadex G-10 hemmte die Substanz das Pilzwachstum um 42 %.

Das eindeutigste Ergebnis wurde mit der agglutinierenden Aktivität nach Anwendung der hydrophoben Interaktionschromatographie erhalten. Die Hemmung betrug bezogen auf das Wachstum der Kontrolle 86 %.

Abb. 34: Zeitverlauf der Hemmwirkung des *Cyperus-esculentus*-Faktors (100 µg/ ml) auf das Wachstum von *Fusarium moniliformis.*



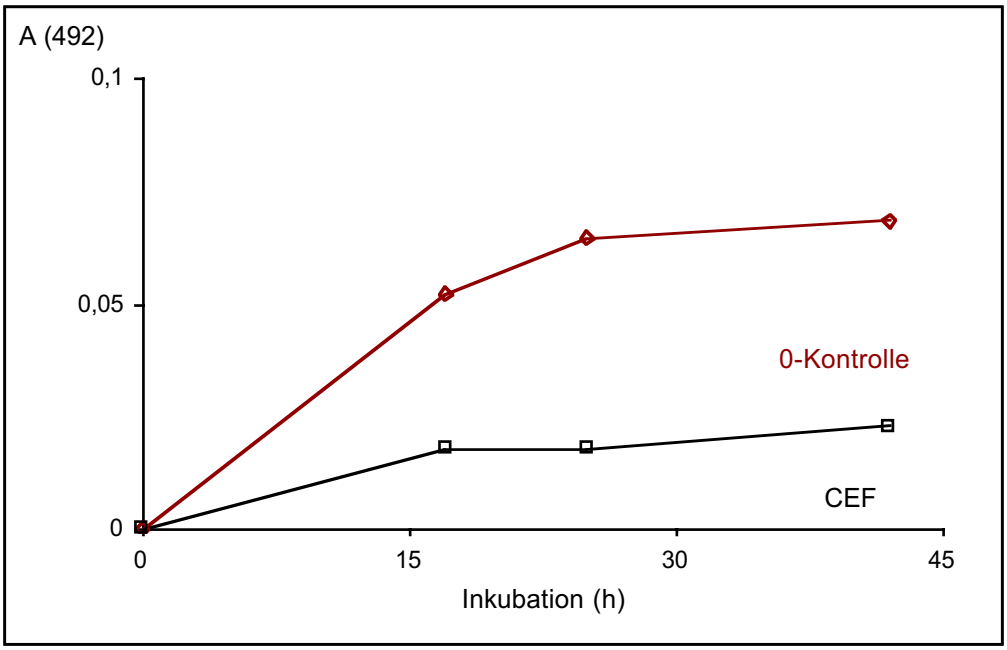
A (492) entspricht der Differenz der Absorption der jeweiligen Inkubationszeit und der ersten Messung nach 30 Minuten Inkubation
0-Kontrolle: Wachstum ohne Zusatz der agglutinierenden Aktivität
CEF: nach HIC, Gelfiltration an Sephadex G-10 und Dialyse

Nach 42 Stunden wird das Wachstum von *Fusarium moniliformis* noch um 65.2 % gehemmt. Die maximale Effektivdosis liegt um 100 µg/ ml.

V.2 Bestimmung der antifungalen Aktivität des *Cyperus-esculentus*-Faktors gegen *Fusarium solani f. pisi*

Die Bestimmung wurde wie bei *Fusarium moniliformis* beschrieben mit verschiedenen Konzentrationen des *Cyperus-esculentus*-Faktors im Mikrotiterplattentest durchgeführt. Das Resultat der Untersuchung zeigt die folgende Abbildung:

Abb. 35: Hemmung des pathogenen Erregers *Fusarium solani f. pisi* durch den *Cyperus-esculentus*-Faktor (100 µg/ ml)



A (492) entspricht der Differenz der Absorption der jeweiligen Inkubationszeit
und der ersten Messung nach 30 Minuten Inkubation
0-Kontrolle: Wachstum ohne Zusatz der agglutinierenden Aktivität
CEF: nach HIC, Gelfiltration an Sephadex G-10 und Dialyse

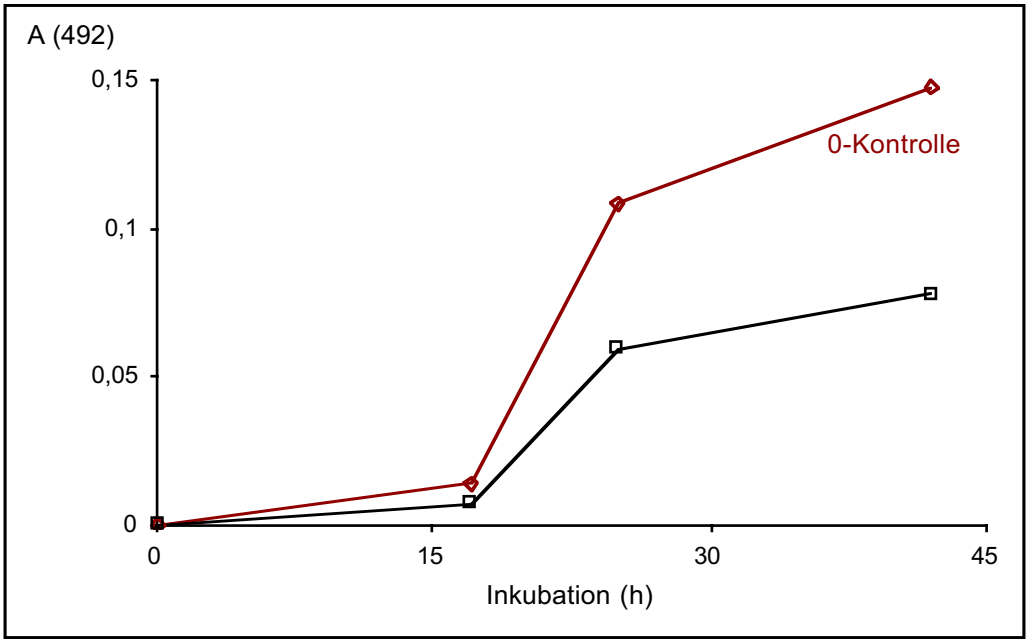
Unter Einsatz der agglutinierenden Aktivität nach HIC mit der Konzentration 0.1 mg/ ml wird das Wachstum des Pathogens nach 17 h um 66.5 % gehemmt. Diese Hemmleistung bleibt bis 42 h Inkubation erhalten. Die Erhöhung der Konzentration des *Cyperus-esculentus*-Faktors auf 0.5 mg/ ml erhöht die Hemmwirkung kaum (68.9 %). Die maximale Effektivdosis liegt demnach auch in diesem Fall um 100 µg/ ml.

Andere Reinigungsstufen zeigen bei dieser Konzentration noch keine Hemmwirkung.

V.3 Bestimmung der antifungalen Aktivität des *Cyperus-esculentus*-Faktors gegen *Fusarium culmorum*

Ebenso wie bei den beiden anderen untersuchten Erregern wurde auch bei *Fusarium culmorum* der *Cyperus-esculentus*-Faktor in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und auf seine potentielle Hemmwirkung getestet.

Abb. 36: Hemmeffekt auf das Wachstum von *Fusarium culmorum*



A (492) entspricht der Differenz der Absorption der jeweiligen Inkubationszeit
und der ersten Messung nach 30 Minuten Inkubation
0-Kontrolle: Wachstum ohne Zusatz der agglutinierenden Aktivität
CEF: nach HIC, Gelfiltration an Sephadex G-10 und Dialyse

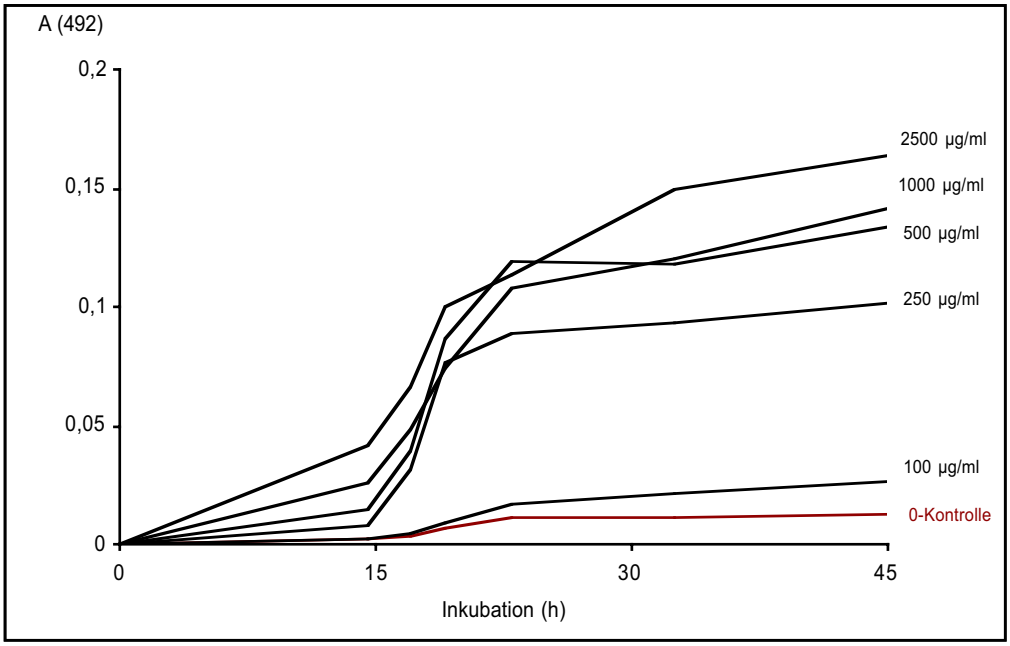
100 µg/ ml der agglutinierende Aktivität des Reinheitssgrades nach HIC hemmte das Wachstum nach 42 h Inkubationzeit um 53 %.

Auch hier hemmten andere Reinigungsstufen bei dieser Konzentration noch nicht das Wachstum des Pflanzenpathogens.

V.4 Test der hemmenden Wirkung auf *Candida albicans*

Candida albicans ist ein Hefepilz und ist auch unter dem Namen Soor bekannt. Hefepilze sind normale "Mitbewohner" der Darmflora und bilden gemeinsam mit den anderen Mikroorganismen ein ökologisches Gleichgewicht. Sie werden speziell von den Lactobakterien im Zaum gehalten. Sobald das Immunsystem geschwächt ist, gerät die Darmflora durcheinander und die Pilze können sich ungehemmt vermehren. Eine solche Dysbakterie hat schwerwiegende Folgen auf den gesamten Organismus. Die wachsende Bedeutung dieses bei immunologischer Entgleisung humanpathogenen Pilzes für das Auftreten unterschiedlichster Erkrankungen wie Arthritis, Asthma, Psoriasis, Unfruchtbarkeit etc. (siehe http://www.hilifeev.de/aa/Candida%20albicans.htm) weckte auch unser Interesse für dessen Untersuchung.

Abb. 37: Test auf die hemmende Wirkung gegen *Candida albicans*



A (492) entspricht der Differenz der Absorption der jeweiligen Inkubationszeit
und der ersten Messung nach 30 Minuten Inkubation
0-Kontrolle: Wachstum ohne Zusatz der agglutinierenden Aktivität
CEF: nach HIC, Gelfiltration an Sephadex G-10 und Dialyse

Die Untersuchung wurde wie die oben beschriebenen Versuche als Mikrotitertest unter identischen Bedingungen durchgeführt. Der Konzentrationbereich des *Cyperus-esculentus*-Faktors lag zwischen 100 - 2500 µg/ ml.

Eine wachstumshemmende Wirkung des *Cyperus-esculentus*-Faktors gegenüber *Candida albicans* konnte nicht beobachtet werden. *Candida* wuchs bei Zugabe des *Cyperus-esculentus*-Faktors sogar besser. Möglicherweise ist die Methode für diese Bestimmung auch ungeeignet, da *Candida* kein Mycel bildet und daher am Napfboden liegt.

VI. Diskussion:

In einer früheren Arbeit[28] war aus der Pflanze *Cyperus esculentus* (Cyperaceae) durch zweimalige Alkalisierung des wässrigen Rohextraktes die agglutinierende Aktivität, nachfolgend *Cyperus-esculentus*-Faktor genannt, gewonnen worden. Der Faktor wirkte hemmend auf das Wachstum von pflanzenpathogenen Pilzen. Die Analyse des anorganischen Anteils ergab einen beachtlichen Anteil an Silicium, welcher vermutlich an der antifungalen Wirkung zu erheblichem Maße beteiligt sein sollte.

Ziel dieser Arbeit war die Fortführung der Reinigung und weitere Charakterisierung der agglutinierenden Aktivität, im besonderen im Hinblick auf die antifungale Wirkung.

Die Isolierung des *Cyperus-esculentus*-Faktors aus einem physiologischen Puffersystem brachte gegenüber der wässrigen Extraktion eine Ionenstärke-unabhängige Verbesserung des Reinigungsgrades verbunden mit der Zunahme des Reinigungsfaktors um 2.8.

Fällungsversuche mit Ammoniumsulfat oder organischen Lösungsmitteln erwiesen sich als ungeeignet. Aus diesem Grund wurde die zweimalige Alkalisierung als 1. Reinigungsschritt beibehalten.

Die Gelfiltration an Sephadex G-25 bzw. -G-10 führte zwar nicht zur erwarteten Erhöhung des Reinigungsfaktors, jedoch trennte sie, durchgeführt an Sephadex G-10, Salze erfolgreich von der agglutinierenden Aktivität ab, was durch kapillarelektrophoretische Messungen (siehe Abb. 24) bewiesen werden konnte.

Der Durchbruch der Reinigung gelang mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) an Phenyl Sepharose High Performance, im Anschluß an die zweimalige alkalische Fällung aus einem physiologischen Puffersystem. Die agglutinierende Aktivität konnte um den Reinigungsfaktor 25 angereichert werden. Daraus resultierte ein Gesamtreinigungsfaktor von 3600.

Diese Optimierung der Reinigung ging gleichzeitig mit einer erheblichen Verstärkung der antifungalen Potenz des *Cyperus-esculentus*-Faktors einher. Verglichen mit der Vorstufe nach zweimaliger alkalischer Fällung erhöhte sich die Hemmwirkung mit der nach HIC gereinigten Substanz bei 17 h Inkubation gegenüber *Fusarium moniliformis* von 5 % aus 86 % (siehe Abb. 33). Diese Fungistatizität blieb bis 42 h erhalten (Abb. 34). Zu diesem Zeitpunkt lag immer noch eine Hemmung von 65.2 % vor.

Ähnliche Werte resultierten auch bei den anderen getesteten Organismen *Fusarium solani f. pisi* (Abb. 35) und *Fusarium culmorum* (Abb. 36).

Unklar bleibt weiterhin die Struktur des *Cyperus-esculentus*-Faktors und welche strukturelle

Komponente (Protein-, Kohlenhydratteil oder anorganischer Bestandteil) der agglutinierenden Aktivität für die antifungale Wirkung verantwortlich ist.
Die Annahme, daß der früher gefundene relativ hohe Silicium-Anteil zu einem erheblichen Maß für die Hemmung des Wachstums der Pflanzenpathogene verantwortlich sein könnte, ist eindeutig zu verneinen, da der Silicium-Anteil chargenabhängig ist, wie drei unabhängige Messungen (siehe IV.7.3) belegen, während die Hemmwirkung auf Pilze nicht von der verwendeten Charge abhängt.

Demzufolge scheint die antifungale Potenz eher vom Proteinanteil abhängig zu sein, und der *Cyperus-esculentus*-Faktor ist möglicherweise den „pflanzlichen Verteidigungspeptiden“ zuzuordnen.
Antimikrobielle Peptide stehen schon lange im Verdacht, eine Schlüsselrolle im pflanzlichen Verteidigungssystem zu haben, sei es als konstitutiv vorhandene, als auch während der Entwicklung regulierte Verteidigungsbarrieren oder als Komponenten der induzierten Abwehr. Inzwischen sind acht Familien antimikrobieller Peptide der Größe 2 - 9 kDa in Pflanzen identifiziert worden. Zu ihnen zählen die Thionine, Defensine, Lipid-Transferproteine (LTPs), Hevein- und Knottin-ähnliche Peptide; die MBP1, IbAMP, die vier Cysteine enthalten und Snakine (entdeckt in der Kartoffel)[84] mit zwölf Cysteinen.
Die Mehrzahl der Thionine haben eine Länge von 45 - 47 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen können in fünf Typen eingeteilt werden, wobei Typ V das C-terminale Nonapeptid fehlt. Das ursprünglich aus dem Endosperm des Weizens isolierte Purothionin besitzt vier Disulfidbrücken, ist sehr basisch und hat keine negativ geladenen Bereiche. Man spricht dem Thioninen eine mögliche Rolle als Thiol-second-messanger in der Redox-Regulation von Enzymen zu. Außerdem sind sie in der Lage, selektiv mit anderen Proteinen Disulfidbrücken bilden[82].
Die Defensine sind im Pflanzenreich weit verbereitet. Sie haben eine Länge von 45 - 54 Aminosäuren und werden in vier strukturell differierende Gruppen unterschieden. Alle bekannten Mitglieder dieser Familie besitzen acht über Disulfidbrücken verbundene Cysteine; desweiteren gibt es weitere Motive, die in allen Typen vertreten sind[83]. Die strukturellen Unterschiede der einzelnen Gruppen wirkt sich auf ihre antimikrobielle Spezifität gegenüber gram-positiven, -negativen und Pilzen aus. Gruppe I inhibiert beispielweise gram-positive Bakterien und Pilze, während Gruppe II nur aktiv gegenüber Pilzen, nicht aber gegenüber Bakterien ist. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, es konnte aber gezeigt werden, daß sie den Einstrom von Calcium-Ionen und den Ausstrom von Kalium-Ionen verstärken[84].

Während bestimmte LTPs verglichen mit den Thioninen eine stärkere antimikrobielle Aktivität gegenüber dem bakteriellen Pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* besitzen, so verhalten sich diese beiden Peptide gegenüber dem Pilz *Fusarium solani* genau umgekehrt. Bei Vorkommen im gleichen Gewebe läßt dies auf eine mögliche gegenseitige Ergänzung schließen[85].
Hevein, das häufigste Protein im Latex der Gummibäume, ist ein Cystein-reiches Protein, das der Chitin-bindenden Domäne verschiedener multidomänaler pflanzlicher Proteine homolog ist[86].
Beide, Hevein- und Knottin-ähnliche Peptide, inhibieren eine Vielzahl an Pilzen und gram-positiven Bakterien *in vitro* und büßen ihre Aktivität durch die Zugabe bivalenter Kationen ein[87].
Die Wirkungsweisen der genannten Proteine sind sehr unterschiedlicher Natur; sie sind selbst bei einer dieser genannten Peptid-Klassen nicht einheitlich auf einen möglichen Mechanismus reduzierbar[88].
Der Wirkmechanismus des *Cyperus-esculentus*-Faktors bleibt unbekannt. Ebenfalls kann er eindeutig zu keiner der aufgeführten Peptid-Klassen hinzugerechnet werden; die Aminosäure Cystein bzw. das über eine Disulfidbrücke verbundene Dimer Cystin konnte mittels zweier voneinander unabhängiger Methoden nicht nachgewiesen werden.

Das im Jahre 1998 gereinigte und charakterisierte antifungale Protein GAFP-1 (*Gastrodia* antifungal-protein 1) aus *Gastrodia elata* (Orchidaceae), das Chitin, immobilisierte Mannose und N-Acetylglucosamin bindet, scheint ebenfalls ein lectinartiges Protein mit hoher inhibitorischer Aktivität gegen bestimmte Pathogene zu sein. Das pH-Optimum für seine inhibitorische Aktivität liegt bei pH 5.0 - 6.0, ähnlich dem Löslichkeitsoptimum des *Cyperus-esculentus*-Faktors[89].

Möglicherweise spielt auch das im *Cyperus-esculentus*-Faktor enthaltene Glucosamin eine wichtige Rolle bei der Verteidigung gegen pflanzliche Pathogene:
Untersuchungen des invasiven Verhaltens des vaskulären Pilzes *Fusarium oxysporum f. sp. radicislycopersici* an Tomatenpflanzen, welche mit dem Bakterium *Bacillus pumilus* (PGPR strain SE 34) behandelt wurden, zeigten eine durch das Bakterium induzierte Resistenz, die sich in Zellwandeinlagerungen als strukturelle Barriere und/ oder Einschluß invasiver Pilzzellen in amorphen Einlagerungen in einigen epidermalen Zellen äußerte. In Tomatenpflanzen, die mit dem Bakterium in Kombination mit Chitosan behandelt wurden, kam es zu einer Verstärkung dieser Effekte, und das Pilzwachstum konnte hauptsächlich auf die Epidermis beschränkt werden[90].
Angesichts dieser Untersuchungen kann man auch für den *Cyperus-esculentus*-Faktor eine durch den Proteinanteil hervorgerufene und durch den Glucosaminanteil möglicherweise verstärkte,

antifungale Potenz annehmen, deren nähere Aufklärung noch offen bleibt.

VII. Zusammenfassung

Entsprechend den Vorarbeiten von C. Heid-Jehn[28] wurde aus den Wurzelknöllchen der Pflanze *Cyperus esculentus* durch wässrige Extraktion ein Faktor isoliert, der als *Cyperus-esculentus*-Faktor (CEF) bezeichnet wurde. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Isolierung und Reinigung zu optimieren, die Reinheit zu prüfen und die chemische Zusammensetzung näher zu charakterisieren. Des Weiteren sollte die biologische Aktivität gegen die Mykotoxine-bildenden Fusariosen im Hinblick auf eine mögliche physiologische Funktion als Bestandteil des pflanzlichen Abwehrsystems gegen Pflanzenpathogene, untersucht werden. Inbesonders sollte die Funktion des früher gefundenen Silikatanteils in die Untersuchungen aufgenommen werden.

Für die Isolierung des agglutinierenden Faktors aus *Cyperus esculentus* erwies sich eine zweimalige Alkalisierung des Extraktes pH 6.4 mit anschließender Gelfiltration an Sephadex G-25 als vorteilhaft. Diese Methode lieferte eine Ausbeute von 81 % und einen Reinigungsfaktor von 143.

Der Zusatz von Salz zum Extraktionspuffer brachte keine Verbesserung der Ausbeute und des Reinigungsfaktors. Die Gelfiltration selbst erzielte nicht den gewünschten Effekt, da sie lediglich zur Entsalzung, nicht aber für eine weitere Erhöhung der Reinheit sorgte. Eine Affinitätschromatographie an Chitosan war einerseits aufgrund der Unlöslichkeit des Faktors oberhalb pH 7.0 und andererseits der Löslichkeit des Chitosans im Sauren schwierig durchzuführen, obwohl D-Glucosamin von der agglutinierenden Aktivität gebunden wird und sein Polymer Chitosan daher eigentlich ein gutes Affinitätsmedium darstellen sollte. Auch Versuche zur Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose brachten nicht den gewünschten Erfolg.

Erst nach Erhöhung der Ionenstärke ($NaCl \longrightarrow (NH_4)_2SO_4$) konnte der CEF durch hydrophobe Interaktionschromatographie weiter gereinigt werden. Diese Methode hatte nach Vereinigung der mittels eines Stufengradienten von Verunreinigungen abgetrennten relevanten Fraktionen, Gelfiltration an Sephadex G-10, Dialyse und abschließender Lyophilisation eine Ausbeute von 81 % mit einem Reinigunsfaktor von 25 zur Folge.

Somit ergab sich ein Gesamtreinigungsfaktor von 3600 nach zweimaliger Alkalisierung, HIC an Phenyl Sepharose HP, Gelfiltration an Sephadex G-10 und Dialyse.

Die Charakterisierung ergab, daß Humanerythrozyten unabhängig von der Blutgruppe gebunden werden, mit einer leichten Präferenz für die Blutgruppe 0. Die Agglutination wird von den Zukkern D-Glucosamin, D-Mannosamin und D-Galactosamin (Grenzkonzentration 25 mmol/ l), nicht aber von deren acetylierten Formen, sowie von den Glycoproteinen Ovomucoid und Asia-

loovomucoid (0.125 - 0.25 mg/ ml) inhibiert. Weitere Oligosaccharidstrukturen werden nicht von der agglutinierenden Aktivität aus *Cyperus esculentus* gebunden.

Der Proteinanteil wurde mit den zur Verfügung stehenden Methoden zu 4.25 % bestimmt. Zu den durch Aminosäureanalyse erfaßten Aminosäuren zählen Arginin, Alanin und Phenylalanin.

Der *Cyperus-esculentus*-Faktor enthält kaum Neutralzucker und nahezu keine Uronsäuren, aber Aminozucker.

Der mittlere Aschegehalt von 43.33 % bekräftigt zunächst das Ergebnis meiner Vorgängerin, die einen organischen Anteil von 53.25 % und einen Glührückstand von 48.7 % ermittelte. Der sehr hohe Anteil an Siliciumdioxid (22 %[28]) konnte allerdings nicht bestätigt werden. Nach direkter Veraschung und anschließender gravimetrischer Silicatbestimmung wurde ein Silicatanteil von nur 5.3 % ermittelt. Das für die strukturelle Aufklärung durchgeführte ^{29}Si CP MAS NMR-Spektrum läßt für das Silicium die Koordinationszahl vier mit benachbarten Sauerstoff-Atomen annehmen. Allerdings wurde dieses Resultat nur in einer von drei unabhängigen Messungen erhalten, so daß der Siliciumgehalt eher chargenabhängig von der Beschaffenheit des Bodens und weiteren Wachstumsbedingungen zu sein scheint.

Das Gesamtmolekulargewicht wurde mittels Gelfiltration auf 11376 ± 1000 Da bestimmt.

In der Aminosäureanalyse fehlen die chromogenen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. In Übereinstimmung dazu wurde ein ungewöhnlich niedriger Absorptionskoeffizient von $\varepsilon^{1\%}$(280 nm) = 0.148 gefunden.

Die Untersuchung des CEF auf seine biologische Aktivität als Abwehrsubstanz gegen Pflanzenpathogene zeigte bei den getesteten Fusariosen *Fusarium solani f. pisi*, *Fusarium moniliformis* und *Fusarium culmorum* eine Hemmwirkung auf das Pilzwachstum, die nicht auf eine Chitinase-Aktivität zurückzuführen ist. Die Hemmwirkung korrelierte mit der Zunahme des Reinheitsgrades des CEF. Die agglutinierende Aktivität nach HIC, Gelfiltration und Dialyse war am wirksamsten. Die Effektivität blieb bis 42 Stunden Inkubation erhalten.

Allerdings beschränkte sich die fungistatische Wirkung auf Pflanzenpathogene. Gegenüber *Candida albicans* trat keine Hemmung auf.

Welche Struktur bzw. strukturelle Komponente für die antifungale Wirkung des *Cyperus-esculentus*-Faktors verantwortlich ist, bleibt allerdings weiter ungeklärt.

VIII. Summary

According to the preceding work of C. Heid-Jehn[28], we isolated from the tubers of *Cyperus esculentus* by aqueous extraction a factor called *Cyperus-esculentus*-Factor (CEF). Aim of the present work was to optimize the isolation and purification, to control the purification degree and to characterize the chemical composition. Furthermore the biological activity against mycotoxin-forming fusarioses with regard to potential physiological function as constituent of the plant-defence-system against plant pathogens should be analyzed. In particular the function of the previously found silica portion should be part of the study.

The isolation of the agglutinating factor from *Cyperus esculentus*, a once-repeated alkaline precipitation of the pH 6.4 extract, followed by gel filtration on Sephadex G-25, proved to be advantageous. This method led to a yield of 81 % and to a purification factor of 143. The addition of salt to the extraction buffer did not enhance the yield or the purification factor. Gel filtration itself attained not the favoured effect because solely the removal of salts was obtained, but not an increase of purity. Though D-glucosamine is bound by the agglutinating factor and its polymer chitosan should be a good affinity medium, it was not possible to carry out an affinity chromatography on chitosan, because on the one hand the factor is insoluble above pH 7.0 and on the other hand chitosan is soluble in acidic media. Attempts to purify the factor by ion-exchange-chromatography on carboxymethylcellulose did not succeed as well.

First after increasing the ionic strength stepwise (NaCl $\longrightarrow$ $(NH_4)_2SO_4$) the CEF could be further purified by hydrophobic interaction chromatography. After pooling the relevant fractions and subsequent gel filtration on Sephadex G-10, dialysis and final freeze-drying, this method resulted in a yield of 81 % with a purification factor of 25.

Thus the total purification factor was 3600 starting from the crude extract after once-repeated alkaline precipitation, HIC on Phenyl Sepharose HP, gel filtration on Sephadex G-10 and dialysis. The characterization resulted in a blood group independent agglutination of human erythrocytes with a slight preference for blood group 0. The agglutination is inhibited by D-glucosamine, D-mannosamine and D-galactosamine (concentration limit 25 mmol/ l), but neither by their acetylated forms, nor by the glycoproteins ovomucoid and asialoovomucoid (0.125 - 0.25 mg/ ml). Other oligosaccharides as far as tested are not bound by the agglutinating activity of *Cyperus esculentus.*

The protein part was determined by the available methods to 4.25 %. The amino acids determined by amino acid analysis are arginine, alanine and phenylalanine.

The *Cyperus-esculentus*-Factor contains hardly neutral sugars and almost no uronic acids, but

amino sugars.

At first the average content of 43.33 % did underline the result of my antecessor, who calculated for the organic fraction 53.25 % and an ash content of 48.7 %. The very high silica content (22 %[28]) however, could not be confirmed. After direct combustion and subsequent gravimetric silica determination, only 5.3 % were detected. The ^{29}Si CP MAS NMR-spectra for the structural elucidation suggests a coordination number of four for silicon with neighbouring oxygen atoms. But this result was only obtained in one of three independent measurements, so that the amount of silicon means to be rather charge-dependent on the soil consistency and futher on the growing conditions.

The total molcular weight was determined by gel filtration to be 11376 ± 1000 Da.

Amino acid analysis revealed the absence of chromogenic amino acids tyrosine and tryptophan. In accordance to this, we found a exceptionally low absorption coefficient of $\varepsilon^{1\%}$(280 nm) = 0.148.

Investigations of CEF concerning its biological activity as defence substance against plant pathogens resulted in an inhibition of fungal growth for the tested fusarioses *Fusarium solani f. pisi*, *Fusarium moniliformis* and *Fusarium culmorum* which is not attributed to a chitinase activity. The inhibition correlated to the increase of the purification factor of CEF. The agglutinating activity after HIC, gel filtration and dialysis was the most active one. The efficiency persisted until 42 hours of incubation.

The fungistatic effect, however, was limited to plant pathogens. Against *Candida albicans* there was no inhibition.

Which structure or structural component, respectively, is responsable for the antifungal activity of the *Cyperus-esculentus*-Factor remains unsettled.

IX. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Rüdiger für die gute fachliche Zusammenarbeit, sein Verständnis und seine Unterstützung durch zahlreiche Ideen und Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir meine Ausbildung und mein berufliches Weiterkommen ermöglicht haben, und mir stets den Rückhalt und die Unterstützung im elterlichen Heim bereiteten.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Freund Jürgen, der mir bei der schriftlichen Abhandlung rücksichtsvoll zur Seite stand.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Annette Kunkel und Herrn Dr. Matthias Degenhardt, ehem. Mitarbeiter des Arbeitskreises von Herrn Prof. Wätzig, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, für die Aufnahme der Kapillarelektrophorese-Diagramme, zahlreichen Anregungen und Diskussionen. Beiden möchte ich an dieser Stelle für das freundschaftliche und fachliche Interesse an meiner Arbeit meinen persönlichen Dank aussprechen.

Bedanken möchte ich mich auch an dieser Stelle bei Herrn Prof. Tacke und dessen Arbeitskreis, Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg für die Messungen der ^{29}Si CP MAS NMR-Spektren und deren Diskussion.

X. Ausblick

Untersuchung von *Cyperus alternifolius* (Zypergras) auf Agglutinationsaktivität

Um zu überprüfen, ob auch andere Cyperaceaeen agglutinierende Faktoren enthalten, wurden Rohextrakte der Samen von *Cyperus alternifolius* mit einem pH-Wert von 4 (Millipore-H_2O), sowie pH 6.7 (Erythrozytenpuffer) hergestellt.
Je 30 mg der in einem Mörser zerkleinerten Samen wurden in je 1 ml Puffer suspendiert und über Nacht bei 4 °C gerührt. Anschließend wurden die Titer der Filtrate bestimmt.

Tabelle 23: Agglutinationsaktivität von *Cyperus alternifolius*

pH-Wert	Titer
4	4
6.7	16

Für die untersuchten *Cyperus alternifolius* Samen wurde Agglutination festgestellt. Die Extraktion bei pH 6.7 in Erythrozytenpuffer lieferte höhere Titer-Werte. Möglicherweise gibt es weitere agglutinierende Aktivitäten in weiteren Cyperaceen, weshalb die Untersuchung derselben sicherlich sehr interessant und vielversprechend wäre.

XI. Experimentalteil

XI.1 Material

XI.1.1 Pflanzenmaterial

XI.1.2 Material

Knollen von *Cyperus esculentus*, Erdmandel (Cyperaceae)

Bezug des Materials: Firma Bornträger & Schlemmer GmbH, Heil-und Gewürzpflanzen
D- 67591 Offstein, Tel.: 06243/7079, Fax.: 06243/7060

XI.1.3 Pilzkulturen

Fusarium solani f. pisi (DSM Nr. 62420), *Fusarium culmorum* (DSM Nr. 1094), Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig

Fusarium moniliformis (M-3215) Fusarium Research Center, Culture Collection, Department of Plant Pathology, 210 Buckhout Laboratory, The Pennsylvania State University, USA

Candida albicans (ATCC 10261), American Type Culture Collection, Rockville, USA

XI.1.4 Reagenzien

Bio-Rad Laboratories, München
Marker
Färbereagenzien

Institut für Transfusionsmedizin, Würzburg
Human-Vollblutkonserven der Blutgruppen A, B und 0

Merck, Darmstadt
Acetonitril, Glycin, Natriumtetraboratdekahydrat

Amersham Bioscience ehem. Pharmacia, Freiburg
Phenyl Sepharose High Performance
HIC Test Kit

Riedl-de Haën, Seelze-Hannover
Natriumazid

Serva, Heidelberg
Acrylamid, N,N‘-Methylen-bisacrylamid, Bromphenolblau, Dialyseschläuche, Natriumdodecylsulfat (SDS)

Sigma, München
Ammoniumpersulfat, Biotin, Biscinchoninsäure, BSA kristallin, Chitin, Chitosan, Coomassie G-250, -R-250, L-Arabinose, D-Fructose, D-Fucose, N-Acetyl-D-galactosamin, N-Acetyl-D-glucosamin, N-Acetyl-D-mannosamin, D-Glucosamin, D-Galactosamin, D-Galactose, D-Galactosamin, D-Glucose, D-Lactose, Maltose, D-Mannosamin, D-Mannose, D-Melibiose, L-Rhamnose, Sephadex G-25, Sephadex G-10, L-Sorbose, Tetramethylendiamin (TEMED), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), D-Xylose

XI.1.5 Verbrauchsmaterial

Becton-Dickinson, Oxnard CA-USA
Falcon Micro Test III Flexible Assay Plate, Falcon Micro Test III Flexible Lid

Laborcenter, Würzburg-Nürnberg: Mikrotiterplatten mit konischem Boden, Latex-Handschuhe, Pipettenspitzen für Eppendorf-Pipetten

Hartenstein, Würzburg: Thoma-Zählkammer

Roth, Karlsruhe: Parafilm

Schleicher & Schuell, Dassel
Celluloseacetat-Folien (CA-Folien): CA 251/250 x 16 mm, ohne Transparenzbad
Ref.-No. 10480107, Lot-Nr.: BY1228-1

Merck, Darmstadt

Kieselgelplatten: DC-Alufolien, Art. 5582, Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator

Serva, Heidelberg: Dialyseschläuche

Alle übrigen Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wurden aus der Chemiekalienausgabe der Universität Würzburg vom höchsten käuflichen Reinheitsgrad bezogen.

XI.1.6 Geräte

Autoklav: Sanoclav Typ KL 121, Wolf, Geislingen

Chromatographiesäulen: Amersham Bioscience, Freiburg und Bio-Rad Laboratories, München

Elektrophoreseapparatur: Mini-Protean II, Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA

ELISA-Photometer: Titertek Multiskan MK II plus, Flow, Meckenheim

ELISA-Platten: Falcon-ELISA-Platten (PVC), Nr. 3912, Becton, Dickinson, Heidelberg

ELISA-Washer: Titertek Microplatewasher S8/12, Flow, Meckenheim

Fraktionssammler: LKB Multirac 2111, LKB, Bromma, Schweden

Gefriertrocknungsanlage: Alpha II-12, Christ, Osterode

Haushaltsmixer: Krups, Solingen; Braun, Frankfurt a. M.

Homogenisator nach Potter: Braun, Melsungen

Kühlzentrifugen: Typ J 2-21, Beckman, München; Typ RC 2B, Sorvall, Vertrieb über Dupont, Bad Nauheim; Typ Vetter ZK 4, Vetter, Wiesloch

Laminar-Flow Kammer: Vertikalstrom-Umluft, Gerätetyp: UVE 6.07. BDK Luft und Reinraumtechnik, GmbH

Leitfähigkeitsmeßgerät: Modell LF 39, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim

Lichtmikroskop: Typ CH, Olympus, München

Membranfilter: Sartorius, Göttingen; Millipore, Neu Isenburg

Mikropipetten: Varipette 4710, Multipette 4780, Eppendorf, Hamburg

Mikrospritzen: Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Mikrotiterplatten: Cooke (Polystyrol, spitzer Boden), Vertrieb: Greiner, Nürtingen

pH-Meter: Typ pH 27, Knick, Berlin

Reagenzglasmischer: Heidolph Elektro KG, Kehlheim

Rührmotoren: Heidolph Elektro KG, Kehlheim

Schlauchpumpe: Microperpex 2132, LKB, Bromma, Schweden

Schüttelgerät: Köttermann, Uelze
Spannungsgerät für Elektrophorese: Power Supply Unit 500/100, Desaga, Heidelberg
Spektralphotometer: Typ PM K2, Carl Zeiss, Oberkochen; Typ Novaspec, Pharmacia-LKB, Freiburg; Typ Ultrospec II E, LKB, Bromma, Schweden; Typ UV-2101 PC, Shimadzu, Duisburg
Tischzentrifugen: Biofuge A, Heraeus-Christ, Osterode; Labofuge II, Heraeus-Christ, Osterode
Trockenschrank: Heraeus, Hanau
Ultrafiltrationszellen: Centricon YM-3 und -10; Amicon, Witten (Ruhr)
Ultraschallbad: Bransonic 32
Waagen: Mettler PL 300, Mettler PN 163, Mettler H 10W, Mettler Waggen GmbH, Gießen
Wasserbad: F 4391, Haake, Berlin Ultratemp 2000 (F30 HC), Julabo
Zählkammer: nach Thoma, Saaringia

XI.2 Methoden

XI.2.1 Rohextraktherstellung

200 g der Knollen von *Cyperus esculentus* wurden in einer Kaffeemühle fein gemahlen und in 1 l dest. Wasser pH 4 suspendiert. Der pH-Wert des Wassers wurde mit HCl eingestellt. Nach dem Homogenisieren wurde der pH-Wert erneut auf 4 eingestellt. Im Anschluß wurde der Ansatz im Mixer für 2 min auf höchster Stufe homogenisiert und der pH-Wert wiederum überprüft und eingestellt. Der Rohextrakt wurde dann über Nacht im Kühlschrank gerührt und am folgenden Tag zentrifugiert (20 min bei 10000 RPM). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand zur vollständigen Fettabtrennung durch einen Faltenfilter filtriert, und es wurde die Ausbeute bestimmt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde für die weitere Reinigung des agglutinierenden Faktors verwendet.

XI.2.2 Bestimmung der Agglutinationsaktivität mittels Hämagglutinationsassay

Herstellung der Erythrozytensuspension

0.4 ml Humanblut der Blutgruppe 0 wurden solange mit je 10 ml 0.05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7.4, 0.1 M NaCl gewaschen und bei möglichst niedriger Drehzahl zentrifugiert, bis der Überstand farblos war. Intakte Erythrozyten sanken dabei zu Boden und konnten auf diese Weise von bereits hämolysierten Erythrozyten abgetrennt werden. Die sedimentierten Erythrozyten wurden anschließend in Puffer aufgenommen, so daß eine ein- bis zweiprozentige Erythrozytensuspen-

sion entstand. Diese Lösung wurde dann sofort zur Titerbestimmung verwendet.

Titertest

Mit Ausnahme der ersten Reihe wurden in jede konische Vertiefung einer Mikrotiterplatte 25 µl 0.05 M Tris-Puffer/ 0.1 M NaCl, pH 8 vorgelegt. Anschließend pipettierte man jeweils in die erste und zweite Reihe 25 µl der zu untersuchenden Lösung. Ab der zweiten Reihe wurden Puffer und Untersuchungslösung gemischt, 25 µl entnommen, in die nächste Reihe übergeführt und so fort. Dadurch entstand eine Reihenverdünnung in Zweierpotenzen. Im Anschluß daran wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 25 µl der Erythrozytensuspension pipettiert und der Titer nach einer Stunde Inkubationszeit abgelesen.
Der Titer ist als der reziproke Wert derjenigen Verdünnung definiert, die gerade noch Agglutination zeigt.
Das Fehlen einer Agglutination wird durch einen roten Punkt am Boden der Vertiefung sichtbar. Dieser rote Punkt setzt sich aus abgesunkenen Erythrozyten zusammen. Bleibt dieses Absinken aus, so findet eine Agglutination, also Vernetzung der Erythrozyten, statt.

XI.2.3 Bestimmung der Zuckerbindungsspezifität

Für den Hemmtest wurden Monosaccharide und stark glykosylierte Proteine eingesetzt. Die Zuckerlösungen wurden in einer Konzentration von 0.2 mol/ l eingesetzt, die Konzentration der Lösungen der Glykoproteine betrug 1 mg/ ml. Der Pflanzenextrakt wurde soweit verdünnt, bis die darin enthaltene agglutinierende Aktivität einen Titer von 4 anzeigte.
Als Erythrozytenpuffer wurde ein 0.05 M Tris/ HCl-Puffer, pH 7.4, 0.1 M NaCl in den Näpfen vorgelegt.

Pipettierschema auf einer Titerplatte

Testansatz:

25 µl Erythrozytenpuffer (siehe unter X.2.3) als Vorlage
+ 25 µl Rohextrakt (Titer 4)
+ 25 µl Zucker- bzw. Glykoproteinlösung
1 h Inkubation bei Raumtemperatur.
+ 25 µl einer 4 % igen Erythrozyten-Suspension

Nach einer weiteren Stunde wird der Test abgelesen.

Negativkontrolle:

50 µl Erythrozytenpuffer (25 µl Vorlage + 25 µl Volumenausgleich)
+ 25 µl Zucker- bzw. Glykoproteinlösung
+ 25 µl Erythrozyten-Suspension

Positivkontrolle:

Das gleiche Schema wie beim Testansatz, nur anstelle Zucker- bzw. Glykoproteinlösung/ 25 µl Erythrozytenpuffer.

Auswertung:

Wenn Agglutination im Testansatz besteht und in der entsprechenden Negativ-Kontrolle als negativ erkennbar ist, wird der eingesetzte Zucker bzw. das Glykoprotein nicht gebunden. Es besteht also keine Hemmung.
Eine Hemmwirkung ist am Ausbleiben einer Agglutination im Testansatz, jedoch einer bestehenden Agglutination in der Positivkontrolle zu erkennen. Der Zucker bzw. das Glykoprotein wird dann von der agglutinierenden Aktivität gebunden.

XI.2.4 Vorreinigung mittels Ammoniumsulfatfällung

Zu je 1 ml Rohextrakt wurde eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Sättigung von 60 bis 80 % zugesetzt. Eine gesättigte Lösung enthält 4.1 mol/ l $(NH_4)_2SO_4$ bei 25 °C. Zur Herstellung einer zu 100 % gesättigten Ammoniumsulfatlösung wurden 760 g $(NH_4)_2SO_4$ in einem Liter dest. Wasser gelöst. Es entstand ein Bodensatz. Die Berechnung der zuzugebenden Ammoniumsulfatlösung erfolgte gemäß der Formel (siehe III.2.1, Allgemeiner Teil).

Für die Fällung mit festem Ammoniumsulfat wurde folgendes Nomogramm zur Bestimmung der Ammoniumsulfat-Menge herangezogen:

Anfangskonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)	Endkonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)																
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
	Zuzugebendes Ammoniumsulfat (g/l)																
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79

Nomogramm zur Bestimmung der Ammoniumsulfat-Menge zur Einstellung einer gewählten Konzentration (in % der Sättigung).

1 ml Rohextrakt wurde demnach mit 561 - 662 mg festem Ammoniumsulfat versetzt und bis zum Lösen des Salzes geschüttelt. Im Anschluß daran wurde bei 10.000 RPM, 10 min zentrifugiert. Vom Überstand sowie von dem gelösten Niederschlag wurden pH-Wert, Titer und die $A_{(280)}$ bestimmt.

XI.2.5 Fällung mit organischen Lösungsmitteln

Zur Fällung mit organischen Lösungsmitteln wurden diese auf -20 °C gekühlt, die Proben in ein Eisbad gestellt und tropfenweise mit dem Lösungsmittel versetzt. Zu je 1 ml Rohextrakt wurden 100 - 1000 µl Aceton bzw. Ethanol zugegeben. Nach Zentrifugation bei 10.000 RPM für 10 min wurden die Überstände in Eppendorf-Caps überführt, die Pellets in Milli-Q-Wasser pH 3.6 aufgelöst und auf Hämagglutination geprüft.

XI.2.6 Reinigung durch pH-Fällung

Zur Fällung der Lectine wurde der pH-Wert mit 6 N NaOH auf 9 - 10 eingestellt und der so erhaltene Niederschlag 20 min lang bei 10.000 RPM abzentrifugiert. Der Rückstand wurde in dest. Wasser, pH 4 gelöst und eine weitere Fällung durchgeführt. Die Lösung des zweiten Niederschlages wurde lyophilisiert.

XI.2.7 Reinigung mittels Gelfiltration an Sephadex G-25 bzw. G-10

Um vorhandene Begleitproteine mit anderen Molmassen von der agglutinierenden Aktivität abzutrennen, wurde das Lyophilisat einer Gelchromatographie (-filtration) unterzogen. Die Gele Sephadex G-25 und G-10 wurden über Nacht im Fließmittel gequollen und im Anschluß daran mindestens zwei Stunden unter Vakuum entgast. Die Säulen wurden kontinuierlich gleichmäßig mit dem Gel befüllt und mit dem zwei-bis dreifachen Säulenvolumen an dest. Wasser pH 4 äquilibriert. Die gelöste Probe wurde vorsichtig auf die Säule aufgegeben, so daß die ebene Oberfläche der Matrix nicht aufgewirbelt wurde. Die Chromatographie wurde im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Zur Ermittlung des Elutionspeaks wurden die Absorptionen der einzelnen Fraktionen bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Die relevanten Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

XI.2.8 Affinitätschromatographie an Chitosan

Zur Reinigung des Chitosans wurde es mit 0.1 M NaOH 2 x 2 h gewaschen und anschließend 3 x mit Milli-Q-Wasser je 15 min alkalifrei gewaschen. Über Nacht wurde das Säulenmaterial in 0.05 M Imidazolpuffer pH 6.5 rühren gelassen. Dem Füllen der Säule schloß sich das Äquilibrieren mit dem 2 - 3 fachen Säulenvolumen dieses Puffers an. 15 mg des Lyophilisats nach zweimaliger Alkalifällung wurden in 1 ml 0.05 M Imidazolpuffer pH 6.5 gelöst. Der Überstand der zentrifugierten Probe wurde vorsichtig auf die Säule aufgetragen. Nach 2 h Inkubation bei RT wurde die Säule mit dem Auftragpuffer gewaschen, um nicht gebundenes Material sowie Verunreinigungen von der Säule auszuwaschen. Als Elutionsmittel diente 0.1 M Boratpuffer pH 6.5. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Eine Elution bei saurem pH-Wert war nicht möglich, da Chitosan im Sauren wasserlöslich ist und seine stark agglutinierende Wirkung beim Nachweis des agglutinierenden Faktors störend gewirkt hätte.

XI.2.9 Ionenaustauschchromatographie[58]

Vorbereitung des Austauschers:
5 g des Kationenaustauschers CM52 (preswollen ion-exchange cellulose, Whatman) wurden in 15 Volumina (v/w) 0.5 N NaOH eingerührt und wenigstens 30 min, aber höchstens 2 h stehengelassen. Nach Absetzenlassen der Suspension wurde der Überstand abdekantiert und in einem Trichter solange nachgewaschen, bis der Durchlauf pH 8.0 erreicht hat. Dann wurde der Ionenaustauscher in 15 Volumina 0.5 N HCl eingerührt und weitere 30 min stehengelassen. Die

zweite Behandlung und das nachfolgende Waschen im Trichter wurde so lange fortgesetzt, bis der filtrierte Durchlauf nahezu neutral war. Anschließend wurde der Austauscher im Äquilibrierpuffer 0.05 M NaOAc, pH 4.0 aufgerührt und abfiltriert. Diese Behandlung wurde solange fortgeführt, bis das Filtrat genau den gleichen pH-Wert und die gleiche Leitfähigkeit wie der Äquilibrierpuffer hatte. Zur Entfernung der Feinteile wurde der Ionenaustauscher erneut im Puffer resuspendiert. Das Gesamtvolumen betrug 30 ml pro g des trockenen Austauschers. Die Suspension wurde in einen Meßzylinder übergeführt und absitzen gelassen. Die zum Absetzen benötigte Zeit errechnet sich aus: t = 1.3 x h, wobei t die Zeit in min ist und h die Gesamthöhe der Mischung im Meßzylinder in Zentimetern. Die überstehende Lösung, die die Feinanteile enthält, mußte sofort dekantiert werden. Das im Meßzylinder zurückbleibende Endvolumen sollte 20 % mehr als das nasse, abgesetzte Volumen betragen. Es wurde dann so viel Puffer hinzugefügt, bis das Endvolumen des Breis 150 % des nassen, abgesetzten Volumens betrug. Mit diesem gewaschenen Ionenaustauscher wurde die Säule [Poly-Prep Chromatography Column (0.8 x 4 cm) der Firma BIORAD] gepackt.

Vor der Chromatographie wurde die Säule mit dem 2 - 3 fachen Säulenvolumen Startpuffer äquilibriert und 75 mg des in 1 ml 0.05 M NaOAc-Puffer, pH 4.0 gelösten Lyophilisats nach zweimaliger Alkalifällung auf die Säule aufgegeben und 2 h bei RT inkubiert. Zur Elution wurde ein NaCl Gradient (0.1 M, 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1.0 M, 1.5 M, 2.0 M) im gleichen Puffer verwendet, und es wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die agglutinierende Aktivität wurde im Eluat durch Absorptionsmessung bei 280 nm und Hämagglutinationstest nachgewiesen.

XI.2.10 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Ermittlung der Bindungskapazität der Phenyl Sepharose HP (batch-Verfahren)

Zur Ermittlung der Bindungskapazität des Säulenmaterials für den *Cyperus-esculentus*-Faktor wurde die Phenyl Sepharose HP zunächst mit dest. H_2O gewaschen und anschließend mit Puffer äquilibriert. Nach dem Absetzen des Materials wurde der Pufferüberstand abgegossen und je ein Aliquot der Phenyl Sepharose HP in Eppendorf-Caps gefüllt. Die zu testenden Mengen an Probenlösung wurden dann sofort zugegeben, aufgeschüttelt und absetzen gelassen. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurde mit den Überständen ein Agglutinationstest durchgeführt. Als Referenz wurden die gleichen Ansätze mit jeweils 0.4 ml $(NH_4)_2SO_4$-Puffer, 3 M pH 4 durchgeführt.

Hydrophobe Interaktionschromatographie[91]

Zur Erprobung der Einsetzbarkeit der hydrophoben Chromatographie wurde der HiTrap™ HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) Test Kit von Amersham Bioscience verwendet. Der Kit besteht aus verschiedenen Medien mit unterschiedlichen hydrophoben Eigenschaften [Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Octyl Sepharose 4 Fast Flow, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub), Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) und Phenyl Sepharose High Performance], vorgepackt in 1 ml Säulen. Die Säulen wurden mit einer normalen Spritze betrieben (Fluß: ca. 1ml/ min).
Die Probe wurde in einem 1.5 M Ammoniumsulfat-Startpuffer gelöst, zentrifugiert und auf die mit dem jeweiligen Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen (1ml Probe, A_{280} = 0.326, Titer 32, Fraktionsvolumen 1 ml, Fraktionierung 1ml/ min). Anschließend erfolgte die Elution mit einem 0.1 M Puffer des gleichen Salzes. Die Puffer kamen in einem pH-Bereich von 4.5 - 7.0 zum Einsatz. Nach jedem Lauf wurden die Säulen mit dest. Wasser freigewaschen, bevor sie erneut mit dem Startpuffer äquilibriert wurden. Zur Aufbewahrung der Säulen wurde 20 % iger Ethanol verwendet.
Die weiteren Versuche wurden an Phenyl Sepharose® HP (Amersham Bioscience) in Poly-Prep Chromatography Columns (0.8 x 4 cm) der Firma BIORAD durchgeführt.
Als Puffer kamen Natriumchlorid/Imidazol und Ammoniumsulfat der Konzentration 1.5 M - 4.0 M in einem pH-Bereich von 4.5 - 6.5 als Startpuffer (Puffer A) zum Einsatz. Als Elutionspuffer (Puffer B) wurden Ammoniumsulfat/ sek. Natriumphosphat bzw. -Imidazol und Imidazol im Konzentrationsbereich 2.5 - 0.05 M, pH 4.0 - 6.5 verwendet.

XI.2.11 Methoden der Proteinbestimmung

Spektralphotometrische Proteinbestimmung[63,64]

Als eine schnell durchzuführende Proteinbestimmungsmethode dient die Absorptionsmessung bei 280 nm. Proteine absorbieren aufgrund ihres Gehaltes an Tryptophan und Tyrosin bei dieser Wellenlänge; dementsprechend ist die Methode von der Art des Proteins abhängig. Die zu vermessende Lösung wird dabei in Quarzküvetten gefüllt und die Absorption bestimmt; als Referenz dient nur das entsprechende Lösungsmittel. Diese Methode ist zwar rasch durchführbar, aber auch störanfällig durch andere vorhandene Substanzen, die ebenso bei dieser Wellenlänge absorbieren.

Proteinbestimmung mit BCA nach Smith *et al.*[59]

Für diese Proteinbestimmungsmethode wird ein Reaktionsreagenz folgender Zusammensetzung hergestellt:

Lösung A: 1 % BCA, 2 % Na_2CO_3, pH 11.2

Lösung B: 4 % $CuSO_4$ x 5 H_2O in Wasser

Lösung A und Lösung B werden im Verhältnis 50 : 1 gemischt.

Zu jeweils 25 µl Probenlösung wird 1 ml BCA-Reagenz pipettiert, 30 min bei 37 °C inkubiert und sofort abgekühlt. Es bildet sich ein violetter Cu(I)-BCA-Komplex, der auf einer Reduktion des Cu(II) zu Cu(I) beruht. Als Standard dient Rinderserumalbumin der Konzentration 1 mg/ ml. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt durch Messen der Absorption bei 562 nm.

XI.2.12 Vorversuche zur Anfärbbarkeit des *Cyperus-esculentus*-Faktors

Um die Anfärbung des CEF zu erproben, werden zunächst einige Vorversuche auf Kieselgelplatten und Celluloseacetat-Folien mit verschiedenen Färbereagenzien vorgenommen.

Kaliumpermanganat-Lösung:

0.1 g in 100 ml H_2O lösen. Den pH-Wert auf 5.0 einstellen.

Ninhydrin-Reagenz: 1 g Ninhydrin werden in 100 ml H_2O gelöst.

Nachbehandlung: 0.5 - 1 h im Trockenschrank bei 80 °C erwärmen

Sprüh- oder Tauchlösung: 0.2 - 0.3 g Ninhydrin werden in 95 ml Methanol gelöst. Die Lösung wird mit 5 ml Collidin versetzt.

Nachbehandlung: 0.5 - 1 h im Trockenschrank bei 80 °C erwärmen.

Ninhydrin-Kupfernitrat-Reagenz:

Lösung I: 0.1 g Ninhydrin wird in 50 ml absolutem Ethanol gelöst. Diese Lösung wird mit 10 ml Eisessig und 2 ml Collidin versetzt.

Lösung II: 1 % ige Kupfernitratlösung in absolutem Ethanol.

Sprüh- oder Tauchlösung: Vor Gebrauch werden Lösung I und II im Verhältnis 50 + 3 gemischt.

Nachbehandlung: 0.5 - 1 h im Trockenschrank bei 80 °C erwärmen.

Es wurde eine Stammlösung hergestellt: c [(*Cyperus-esculentus*-Faktor nach zweimaliger Alka-

lisierung und Gelfiltration an Sephadex G-10)] = 1 mg/ 200 µl H_2O

Davon wurden jeweils 10 µl aufgetupft. Nach Trocknen wurde die Kieselgelplatte mit dem jeweiligen Reagenz besprüht.

XI.2.13 Celluloseacetatmembran-Elektrophorese[92]

Celluloseacetat-Folien ermöglichen elektrophoretische Trennungen, die von der Größe der Ladung und vom Molekulargewicht der Proteine abhängen. Ionisierte Moleküle wandern entsprechend ihrer elektrischen Ladung zum positiven oder negativen Pol. Konvektion wird durch die Membran vermieden, aber die Diffusion nicht völlig verhindert, was sich nachteilig auf die entstehenden Banden auswirkt. Die Zonen werden relativ breit, die Auflösung und die Detektionsgrenze ist gering. Vorteile bietet das Handling, die schnelle Durchführbarkeit der Trennung, sowie die rasche Anfärbbarkeit. Die CA-Folien werden in eine Horizontalapparatur in ein Pufferresservoir (Tank) so eingebracht, daß beide Enden mit dem Puffer über Filterpapierbrücken in Kontakt stehen.

Die Folien können auf die gewünschte Größe zugeschnitten werden, somit kann man sich den Vorteil guter Trennungsmöglichkeiten über kurze Distanz zunutze machen. Um eine Kontamination der CA-Folien zu vermeiden, müssen stets Handschuhe getragen werden.

Die Celluloseacetatmembran (CAM) darf nie direkt Kontakt zu dem Puffer haben. Um das zu vermeiden, verwendet man Filterpapierstreifen, welche in den Puffer eingetaucht sind und den Kontakt zwischen Puffer und der CAM mit beiden Seiten herstellen.

Die Elektrophorese wird unter konstanter Stromstärke durchgeführt, bei einer korrespondierenden Spannung von 0.4 mV pro Zentimeter Folienlänge. Ein Elektrophoreselauf dauert ca. 30 - 90 min für eine 4 - 6 cm lange Trennstrecke. Die Folien werden anschließend entweder in einem Ofen bei 80 - 100 °C getrocknet oder in ein Fixierbad eingelegt. Im Anschluß daran werden die Folien in einem geeigneten Färbebad angefärbt, dann in Entfärber gewaschen, bis die Folie weiß ist und der Entfärber klar bleibt.

Um ein Schmelzen der CA-Folien durch Erwärmen zu vermeiden, werden diese nach dem Färbebad einem Transparenzbad unterzogen. Hierzu werden die CA-Folien in das jeweilige Färbereagenz eingelegt, dann solange in frischen Entfärber gelegt, bis der Entfärber farblos bleibt. Den Abschluß bildet die Entwässerung durch Einlegen in Methanol für 1 min Anschließend werden die CA-Folien auf einen Objektträger gelegt und 30 sek in ein Transparenzbad (4 Teile Methanol, 1 Teil Eisessig, frisch hergestellt) gebracht, 2 min an der Luft und 10 - 20 min in einem Trockenschrank bei 70 - 80 °C getrocknet. Die Folien erscheinen dann transparent, die gefärbte Zone

bleibt bestehen.

Vorbehandlung der CA-Folien:

Zur Sättigung der Folie mit Puffer wurde sie auf die Oberfläche des Elektrophorese-Puffers gelegt; dabei mußte man die Enden festhalten, um ein Zusammenrollen der Folie zu vermeiden. Die Flüssigkeit wurde auf diese Art durch Kapillarkräfte in die Poren gesogen. Anschließend tauchte man sie vollständig in den Puffer ein. Dann wurde die Folie wieder aus dem Puffer herausgenommmen und wurde, ohne Druck auszuüben, zwischen zwei Filterpapiere gelegt.

Probenauftrag:

Die Probe (0.2 - 0.5 µl pro cm an Trennstrecke) wurde mit einer Kapillare in die Mitte der Folie als Linie aufgebracht und trocknen gelassen.

Elektrophorese:

Die Folie wurde in der Apparatur wie oben beschrieben positioniert, und es wurde 10 min bei geschlossener Apparatur abgewartet, um für eine ausreichende Sättigung der Folie und der Kammer zu sorgen.

Für einen 8 cm langen Streifen wurde eine Spannung von 200 V eingestellt. Dabei stellte sich eine Stromstärke von 1 - 2 mA ein. Die Elektrophoresedauer betrug 60 min.

Elektrophorese-Puffer 1: Eisessig: Pyridin: H_2O = 45: 5: 950 (V/ V), pH 3.3.

Elektrophorese-Puffer 2: 14.4 Glycin, 3 g Tris ad 1000 ml, pH 7.3.

Elektrophorese-Puffer3: 7.2 g Glycin, 1.5 g Tris ad 1000 ml, pH 7.0.

Färbung:

Die Folie wurde nach erfolgter Elektrophorese über Nacht in ein Coomassie Blue R-250 Färbebad (s.u.) gelegt.

Entfärbung:

Die Folie wurde aus der Färbelösung genommen und solange in den Entfärber gelegt, bis dieser klar blieb.

Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blue R-250: $C_{42}H_{36}O_6N_3S_2$; Mr = 742 g/ mol

Coomassie 0.1 % in	Essigsäure	10 Teile
	Wasser	90 Teile
	Methanol	50 Teile

Entfärber:

Wasser	65 Teile
Methanol	25 Teile
Essigsäure	10 Teile

XI.2.14 Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)[93]

Die Elektrophorese wurde in saurem Milieu (pH 4.5) durchgeführt. Es wurden Gele mit einer Schichtdicke von 0.75 mm und einer Acrylamidkonzentration von 12 % hergestellt. Die Elektrophorese wurde mit einem Alaninpuffer bei pH 4.5 ausgeführt. Als Probe wurden 5 mg CEF in 30 ml des Elektrophoresepuffers gelöst und in die Geltaschen eingebracht.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen. Hierzu diente zum einen ein "Silver Stain Kit" der Firma Merck, zum anderen eine Vorschrift aus Pharmacia LKB Biotechnologie.

Tabelle 24: Pipettierschema zur Herstellung des Trenngeles

Trenngelkonzentrat	3.75 ml
Trenngelpuffer	3.75 ml
dest. Wasser	5.5 ml
SDS 10 %	100 µl
Glycerin	2.46 g
TEMED	50 µl
APS 10 %	300 µl

Tabelle 25: Zusammensetzung des Trenngelkonzentrats

Acrylamid	15.0 g
Bisacrylamid	0.7 g
SDS 10 %	100 µl
dest. Wasser	36.0 ml

Herstellung des Trenngelpuffers:

2.8 g KOH in 90 ml Wasser lösen, den pH-Wert mit Eisessig auf 4.3 einstellen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

Zusammensetzung des Elektrodenpuffers:

3.9 g β-Alanin in 980 ml Wasser lösen, 1 g SDS hinzufügen und den pH-Wert auf pH 4.5 mit Eisessig einstellen. Mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Probenvorbereitung:

5 mg Probe in Elektrodenpuffer lösen. Zur Sichtbarmachung der Probenwanderung wurde etwas Bromphenolblau zugesetzt. Die Probe wurde 5 min im Wasserbad zur Denaturierung gekocht.

Probenaufgabe:

Von der Lectinlösung werden 10 bzw. 15 µl aufgetragen.

Nach dem Auftragen der Proben wurde die innere Elektrophoresekammer in die äußere, die ebenfalls mit Elektrodenpuffer gefüllt war, gestellt und die Trennung 2.5 h mit konst. Stromstärke von 20 mA bei umgekehrter Polung durchgeführt. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus der Gießform entnommen, unter leichtem Schütteln mit verschiedenen Reagenzien angefärbt und dann mehrmals entfärbt.

Detektion:

Zur Detektion wurden die Gele in 0.25 % Coomassielösung unter häufigem Schütteln gebadet. Danach wurde überschüssiger Farbstoff durch mehrere Portionen Entfärberflüssigkeit herausgewaschen bzw. ein Silver staining Kit der Firma Merck angewendet.

Coomassie Brilliant Blue R-250:

Färbelösung: 0.25 % Coomassie in Methanol: Eisessig: H_2O = 5 : 1 : 5 (V/ V).

Färbedauer: 0.5 - 2 h.

Procion Brilliant Blau RS = Cibacron Blue 3GA:

Färbelösung: 1 % in 10 % iger Essigsäure + 50 % igem Methanol.

Färbedauer: 1 - 2 h.

Entfärber: Methanol: Eisessig: H_2O = 5 : 1 : 5 (v/ v).

XI.2.15 Hochleistungs-Flüssigchromatographie

stationäre Phase: Nucleosil RP-18, 125 x 4 mm, Macherey-Nagel

mobile Phase: 0.1 M Phosphatpuffer/ Acetonitril/ H_2O

Tabelle 26: Puffer-Mischungen

Phosphat-puffer	Acetonitril	H_2O
1	1	-
1	1	1
4	1	-
10	1	-

Flußraten: 1.0 ml/ min, 0.7 ml/ min, 0.5 ml/ min

Temperatur: RT

Detektion: Absorptionsmessung, 254 nm

Pufferherstellung:

Für die Herstellung eines 0.1 M Phosphatpuffers wurden 1 Teil 0.05 M Na_2HPO_4 und 1 Teil 0.05 M NaH_2PO_4 x 2 H_2O gemischt.

XI.2.16 Aminosäurebestimmung nach saurer Hydrolyse[67]

10 mg Phenol wurden in 1 ml 6 N HCl gelöst. 500 µl dieser Lösung wurden auf den Boden des Pico-Tag-Behälters für die Hydrolysegefäße pipettiert. In den Pico-Tag-Behälter (Firma Waters) können 7 Hydrolysegefäße gestellt werden. In 45 mm Höhe befindet sich ein nach außen stehender Glaswulst, der in das Glas eingeschmolzen ist, und an dem die kondensierende HCl entlang laufen kann, ohne in die Hydrolysegefäße zu gelangen. Die Hydrolysegefäße wurden in die Salzsäure gestellt und das Pico-Tag-Gefäß verschlossen. Durch dreimaliges abwechselndes Anlegen von Vakuum und Stickstoff (jeweils 15 sek über Dreiwegehahn; Wasserstrahlpumpenvakuum) wurde der Sauerstoff weitestgehend entfernt. Das unter Vakuum stehende Pico-Tag-Gefäß wurde 24 h auf 108 °C erhitzt, heiß geöffnet und die Hydrolysegefäße entnommen. Sie wurden 30 min im Exsikkator über NaOH im Vakuum getrocknet.

Als Standard wurden verschiedene Aminosäuren verwendet und auf eine Kieselgelplatte zur Dünnschichtchromatographie aufgetragen und detektiert.

XI.2.17 Uronsäuren-Bestimmung[68]

Zur quantitativen Bestimmung der Uronsäuren wurde ein Microtiterplatten-Test herangezogen.

Standard-Bedingungen:

In jeden Napf einer Microtiterplatte wurden 40 µl Probe pipettiert und vorsichtig 200 µl konzentrierte Schwefelsäure 96 % (v/v), die 120 mM Natriumtetraborat enthielt, hinzugefügt und gemischt. Die Platte wurde für eine Stunde bei 80 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT wurde die Hintergrundabsorption der Proben bei 540 oder 490 nm mit einem ELISA-Reader gemessen. Dann fügte man 40 µl m-Hydroxydiphenyl Reagens [100 µl m-Hydroxydiphenyl in Dimethyl-sulfoxid, 100 mg/ ml, gemischt mit 4.9 ml 80 % iger (v/v) Schwefelsäure erst vor dem Gebrauch] hinzu und mischte die Proben. Nach 15 min wurde die Absorption der rosa-farbigen Proben erneut bei 540 oder 490 nm gemessen. Die Werte der Hintergrundabsorption wurden von der zweiten Messung abgezogen und der Uronsäuregehalt anhand einer Standardkurve interpoliert.

Ein hoher Neutralzuckergehalt kann die Messung durch eine auftretende Braunfärbung stören; dies kann jedoch durch Subtraktion der Hintergrundabsorption von der zweiten Messung gut korrigiert werden.

XI.2.18 Quantitative Bestimmung des Neutralzuckergehaltes nach Dubois et al.[69]

Basis dieser Analysenmethode ist, daß Zucker in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure Furfurale bilden, die mit Phenolen zu Triarylmethanfarbstoffen reagieren können. Diese Chromophore können bei 490 nm quantitativ bestimmt werden.

Standardbedingungen:

Zu 200 µl Probenlösung wurde 1 ml konzentrierte Schwefelsäure gegeben, es folgten 200 µl einer 5 % igen Phenollösung. Der Ansatz wurde gut gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm vermessen.

Abweichend von diesen Bedingungen wurde der Versuch in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Hierfür wurden 40 µl Probe mit 200 µl konz. Schwefelsäure versetzt, dann 40 µl der Phenollösung hinzugefügt. Nach der Inkubationszeit von 30 min wurde die Absorption bei 490 nm mit einem ELISA-Reader vermessen.

XI.2.19 Bestimmung des Aschegehaltes (Glührückstandes durch direkte Veraschung)

Ein Platintiegel wurde bei 550 - 800 °C im Muffelofen bis zur Gewichtskonstanz geglüht. In diesen Tiegel wurden 300 mg des *Cyperus-esculentus*-Faktors nach zweimaliger Alkalifällung eingewogen und bei 550 °C, 3 h geglüht, bis die Asche weiß aussah. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde der Tiegel gewogen. Das Verfahren wurde wiederholt, um sicher sein zu können, daß die trockene Veraschung abgeschlossen war.

XI.2.20 Gravimetrische Silikatbestimmung[71]

Dem nach VI.2.19 erhaltenen Glührückstand wurde 1 ml konz. Schwefelsäure und 5 ml Flußsäure (40 %) zugesetzt und der Platintiegel über dem Bunsenbrenner erhitzt. Dabei wurde Flußsäure zusammen mit SiF_4 freigesetzt und verflüchtigt. Um die Kieselsäure vollständig zu vertreiben, wurde das Verfahren wiederholt. Am Ende wurde erhitzt, bis Schwefelsäuredämpfe entwichen. Der auf diese Weise erhaltene Rückstand wurde erneut im Muffelofen bei 600 °C bis zur Gewichtskonstanz geglüht.

XI.2.21 Molmassenbestimmung

Für die Molmassenbestimmung des agglutinierenden Faktors aus *Cyperus esculentus* wurde eine Gelfiltration an Sephadex G-50 durchgeführt. Für die Kalibrierung der Säule wurde H_2O pH 4 eingesetzt.

Vor der Gelfiltration wurden alle als Marker dienende Substanzen einzeln auf Löslichkeit im Puffer geprüft und von jeder Substanz ein Absorptionsspektrum von 200 bis 700 nm gemessen, um die unter diesen Bedingungen geltenden Absorptionspeaks zu bestimmen. Dextranblau diente als Indikator von Ausschluß- bzw. Endvolumen der Säule. Als Molekulargewichtsmarker wurden Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12.4 kDa) und Aprotinin (6.5 kDa) verwendet. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit drei Punkten. Die Marker wurden einzeln aufgetragen und photometrisch bestimmt. Mit den dabei entstandenen Punkten wurde mittels linearer Regression eine Kalibriergerade erstellt.

Säulenmaterial: Sephadex G-50
Säule: 1 cm x 57 cm
Flußrate: 1.0 ml/ 4.6 min
Fraktionsgröße: 1.0 ml

Probenvolumen: 500 µl

Elutionsmittel: H_2O, pH 4

XI.2.22 Bestimmung der antifungalen Aktivität des *Cyperus esculentus*-Faktors

Pilzkulturen

Fusarium solani f. pisi (DSM No. 62420, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig)

Stammkultur auf Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA-Potato Dextrose Agar)

Tabelle 27: Stammkultur auf Kartoffel-Dextrose-Agar

Kartoffelinfus*	1000 ml
Glucose	20 g
Agar	15 g

*Für mikrobiologische Nährmedien ´hergestellte Infuse sind wässrige Aufgüsse aus Fleisch, Hirn, Mais, Kartoffeln u.a.[94].

Für die Herstellung des Kartoffelinfus s.u..

Fusarium moniliformis (M-3215, Fusarium Research Center, Culture Collection, Department of Plant Pathology; 210 Buckhout Laboratory. The Pennsylvania State University).

Tabelle 28: Stammkultur auf Selektiv-Nährstoffarmen-Medium (SNA)[95]

KH_2PO_4	1.0 g
KNO_3	1.0 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0.5 g
KCl	0.5 g
Glucose	0.2 g
Saccharose	0.2 g
Aqua dest.	1.0 l
Agar-Agar	17 - 20 g

Candida albicans (DSM No.1386)

Tabelle 29: Stammkultur auf YPD (Yeast, Peptone, Dextrose) Medium

Pepton	2 %
Hefeextrakt	1 %
Glucose	2 %
Agar	1.5 %

Anzucht der Pilzkulturen

Zur Gewinnung der Konidiosporen wurde ein nährstoffarmer halbkonzentrierter Kartoffelinfus verwendet. Die nachfolgend beschriebene Anzucht der Konidiosporen erfolgte für die vier verwendeten Pilzkulturen von *Fusarium solani f. pisi, Fusarium moniliformis, Fusarium culmorum* und *Candida albicans*.

Es wurden Sporensuspensionen der oben genannten Pilzstämme in gleicher Konzentration hergestellt. In einer Mikrotiterplatte wurde der *Cyperus-esculentus*-Faktor in unterschiedlichen Konzentrationen (0.1 - 5.0 mg/ ml) und Reinigungsstufen zu einer konstanten Sporenzahl pro Napf auf das gleiche Endvolumen zupipettiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über 2 - 3 Tage bei 25 °C im Dunkeln. Die Auswertung erfolgte photometrisch durch Messung einer durch das Pilz-wachstum verursachten Trübung bei 492 nm. Das Resultat für jeweils eine Substanzkonzen-

tration entspricht dem Durchschnitt aus je 8 Meßwerten. Ein Ansatz mit der gleichen Sporenzahl pro Endvolumen Nährlösung ohne den Zusatz des *Cyperus-esculentus*-Faktors diente als Positiv-Kontrolle (0-Kontrolle mit 100 % Wachstum) für das Pilzwachstum. Nach 30 min Inkubation wurde die erste Messung vorgenommen und als Nullwert für jede einzelne Verdünnungsstufe festgehalten. Dieser Wert wurde nach den verschiedenen Inkubationszeiten von der jeweiligen Absorption abgezogen.

Herstellung des Kartoffelinfus

Für diesen Zweck wurden 100 g kleingeschnittene Kartoffelscheiben mit 1 l dest. Wasser versetzt und 5 min gekocht. Der Überstand wurde zunächst durch ein sauberes Küchentuch koliert und anschließend durch einen Faltenfilter filtriert. Nach dem Abkühlen wurde das Filtrat mit HOAc auf pH 5.5 eingestellt und bei 121 °C, 1.5 atm 15 min autoklaviert.

Herstellung der Nährlösung

Hierfür wurden 120 ml des Kartoffelinfus mit dest. Wasser zu 1 l ergänzt, mit HOAc auf pH 5.5 eingestellt und anschließend unter den oben angegebenen Bedingungen autoklaviert. Als Nährlösung bezeichnet man die als Vorlage für die Hemmversuche in den Mikrotiterplatten verwendete Lösung.

Impfung

Ein enghalsiger Erlenmeyerkolben wurde auf etwa 1/5 des Volumens mit Kartoffelinfus gefüllt, mit Alufolie zugedeckt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen erfolgte die Beimpfung unter Laminar-flow-Bedingungen. Mit einer ausgeglühten und wieder abgekühlten Öse wurde etwas Mycel der Stammkultur aus dem Schrägagarröhrchen entnommen und in den Kartoffelinfus getaucht. Nach Abflammen des Erlenmeyerkolbenhalses wurde dieser mit Alufolie abgedeckt und unter zirkulärem Schütteln bei Raumtemperatur gehalten. Nach ca. 10 Tagen Inkubation hatten sich in der Regel ausreichend Konidien gebildet. Wegen der Reproduzierbarkeit der biologischen Versuche ist es empfehlenswert Pilzkulturen, ähnlichen Alters zu verwenden (z.B. zwischen 15 und 20 Tagen nach Ansetzen).

Herstellung der Testsporensuspension

Ein Aliquot der ausgewachsenen Pilzkultur wurde durch einen Rundfilter in ein Zentrifugenglas filtriert. Das Filtrat wurde dreimal mit dest. Wasser gewaschen und jeweils 10 min bei 5000 RPM abzentrifugiert. Die Anzahl der Sporen wurde mittels einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Das Volumen der Sporensuspension wurde so eingestellt, daß die Sporenzahl/ Großquadrat zwischen 50 und 80 liegt[96].
Die Bestimmung der Sporenzahl erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Sporenzahl/Großquadrat x 106}}{4}$$

Die Sporenzahl/ Großquadrat entspricht dem Durchschnitt aus 4 in der Diagonalen gezählten Großquadrate. Für die Herstellung der Testsporensuspension (20.000 Sporen/ ml NL) wurde das entsprechende Volumen aus der bereits bestimmten Suspension mit Nährlösung auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Um eine homogene Zellzahl/ml während des Pipettiervorganges zu bewahren, wurde die Testsporen-Suspension unter ständigem Rühren gehalten.

Versuchsdurchführung

Für diesen Versuch wurden unter UV-Licht entkeimte Mikrotiterplatten (Falcon 3913 aus Polyvinylchlorid) verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels einer photometrischen Bestimmung bei 492 nm.
Es wurden Sporensuspensionen der oben genannten Pilzstämme in gleicher Konzentration hergestellt. In einer Mikrotiterplatte wurde der *Cyperus-esculentus*-Faktor gelöst, in Nährlösung in unterschiedlichen Konzentrationen (0.1 - 2.5 mg/ ml) und Reinigungsstufen zu einer konstanten Sporenzahl pro Napf, auf das gleiche Endvolumen zupipettiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über 2 - 3 Tage bei 25 °C im Dunkeln. Die Auswertung erfolgte photometrisch durch Messung einer durch das Pilzwachstum verursachten Trübung bei 492 nm. Das Resultat für jeweils eine Substanzkonzentration entspricht dem Durchschnitt aus je 8 Meßwerten. Ein Ansatz mit der gleichen Sporenzahl pro Endvolumen Nährlösung ohne den Zusatz des *Cyperus-esculentus*-Faktors diente als Positiv-Kontrolle (0-Kontrolle mit 100 % Wachstum) für das Pilzwachstum. Nach 30 min Inkubation wurde die erste Messung vorgenommen und als Nullwert für jede einzelne Verdünnungsstufe festgehalten. Dieser Wert wurde nach den verschiedenen Inkubationszeiten von der jeweiligen Absorption abgezogen.

Für jede Konzentration wurde eine vertikale Reihe der Mikrotiterplatte angelegt, und in jeden Napf wurden 50 µl der Probenlösungen pipettiert. Als Kontrolle wurden die Näpfe zweier Reihen je mit 50 µl Nährlösung gefüllt. Anschließend wurden in jeden Napf 50 µl der Sporensuspension pipettiert, so daß die Sporenzahl pro Napf 2000 betrug. Nach Beendigung des Pipettiervorganges wurden die Platten zum Absetzen der Sporen 30 min bei 25 °C im Dunkeln stehengelassen.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte photometrisch durch Messen der Absorption bei 492 nm.
Gemessen wurde eine Trübung, die bei fortschreitendem Pilzwachstum umso stärker ausgeprägt und an einem höheren Absorptionswert feststellbar war.

XII. Literatur

1. Sumner, J. B. (1919) The globulins from the jack bean, *Canavalia ensiformis*, *J. Biol. Chem.* **37**, 137-142.

2. Landsteiner, K., Raubitschek, H. (1907) Zentralbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. **45**, 660-667.

3. Boyd, W. C., Shapleigh, E. (1954) Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins), *Science* **119**, 419.

4. Rüdiger, H. (1981) Lektine - Vorkommen, Anwendung und Funktion, *Chemie in unserer Zeit* **15**, 155-162.

5. Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980) What should be called a lectin?, *Nature* **285**, 66.

6. Kocourek, J., Horejsí, V. (1981) Defining a lectin, *Nature* **290**, 188.

7. Brechtel, R., Wätzig, H., Rüdiger, H. (2001) The lectin from the mushroom *Pleurotus ostreatus*: a phosphatase-activating protein that is closely associated with an alpha-galctosidase activity, *Plant Science* **161**(821), 1025-1033.

8. Sharon, N., Lis, H. (1990) Legume lectins - A large family of homologous proteins, *FASEB J.* **4**, 3198-3208.

9. Guillot, J., Konska, G. (1997) Lectins in higher fungi, *Biochemical Systematics and Ecology* **25(3)**, 203-230.

10. Sharon, N. (1987) Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease, *FEBS Lett.* **271/2**, 145-157.

11. Lis, H., Sharon, N. (1986) Lectins as molecules and as tools, *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 35-67.

12. Hodgin, R. L., Pricer, W. E., Ashwell, G., Stockert, R. J., Morell, A. G. (1974) The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoprotein, *J. Biol. Chem.* **249**, 5536-5543.

13. Powell, J. T. (1980) Purification and properties of lung lectin. Rat lung and human lung β-galactoside-binding protein, *Biochem. J.* **187**, 123-129.

14. Rüdiger, H., Gabius, H. J. (1993) Lectinologie: Geschichte, Konzepte und pharmazeutische Bedeutung, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **133**, 15-25.

15. Luther, P., Becker, H. (1987) *Die Mistel - Botanik, Lectine, medizinische Anwendung,* Springer Verlag, Heidelberg.

16. Gers-Barlag, H., Schecher, G., Siva-Kumar, N., Rüdiger, H. (1993) Protein body membranes

as binding partners of lectins, in: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, E. van Driessche, H. Franz, S. Beeckmans, U. Pfüller, A. Kallikorm, T. C. Bøg-Hansen (Herausg.), Textop, Hellerup (Dänemark) Bd. **8**, S. 101-104.

17. Croy, R. R. D., Hoque, M. S., Gatehouse, J. A., Boulter, D. (1984) The major albumin proteins from pea (*Pisum sativum L.*), *Biochemistry* **218**, 795-803.

18. Freier, T., Rüdiger, H. (1987) In vivo binding patterns of the *Lens culinaris* lectin, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 1215-1223.

19. Einhoff, W., Rüdiger, H. (1989) Leguminous glycosidases: hydrophobic and lectin-binding properties, *Phytochemistry* **28**, 355-357.

20. Rüdiger, H., Bartz, I. (1993) The phosphatase from *Canavalia ensiformis* seeds interacts with *Concanavalin A*, the lectin from the same plant, in: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, E. van Driessche, H. Franz, S. Beeckmans, U. Pfüller, A. Kallikorm, T. C. Bøg-Hansen (Herausg.), Textop, Hellerup (Dänemark) Bd. **8**, S.92-96.

21. Díaz, C. L., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J., Lugtenberg, B. J. J., Kijne, J. W. (1989) Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis, *Nature* **338**, 579-581.

22. Kijne, J., Díaz, C., De Pater, S., Lugtenberg, B. (1992) Lectins in the symbiosis between rhizobia and leguminous plants, *Adv. Lectin. Res.* **5**, 15-20.

23. Díaz, C. L., Lems-van Kau, P., van der Schaal, I. A. M., Kijne, J. (1984) Determination of pea (*Pisum sativum L.*) root lectin using an enzyme-linked immunoassay, *Planta* **161**, 302-307.

24. Díaz, C., Hosselet, M., Logman, G., van Driessche, E., Lugtenberg, B., Kijne, J. (1990) Distribution of glucose/mannose specific isolectins in pea (*Pisum sativum L.*) seedlings, *Planta* **181**, 451-461.

25. Díaz, C., Logman, G., Stam, J., Kijne, J. (1995) Sugar-binding activity of pea lectin expressed in white clover hairy roots, *Plant Physiol.* **109**, 1167-1177.

26. Freytag, S., Hahlbrock, K. (1992) Abwehrreaktionen von Pflanzen gegen Pilzbefall, *Biol. unserer Zeit* **22**, 135-142.

27. Callow, J. (1977) Recognition, resistance and the role of plant lectins in host-parasite interactions, *Adv. in Biochem. Res.* **4**, 1-49.

28. Heid-Jehn, C. (1997) Isolierung und Charakterisierung des agglutinierenden Faktors aus *Cyperus esculentus* und dessen antifungale Wirkung, Dissertation, Würzburg.

29. Siebert, H. C., von der Lieth, C. W., Gabius, H. J. (1999) Der Zuckercode, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **139**, 272-282.

30. Rüdiger, H., Gabius, S., Gabius, H. J. (2000) Neues aus der Lectinologie, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **140**, 1963-1973.

31. Gabius, H. J., Bovin, N. V., Brinck, U., Gabius, S., Unverzagt, C., Kayser, K. (2000) Carrier-immobilized carbohydrate ligands: design of the lectin-detecting tools and their clinical applications with focus on histopathology, in: *Lectins and Pathology*, M. Caron, A. P. Seve (Herausg.), Overseas Publishers Association, Amsterdam.

32. Gabius, H. J. (2001) Glycohistochemistry: The Why and How of Detection and Localization of Endogenous Lectins (Review), *Anat. Histol. Embryol.* **30**, 3-31.

33. Van Driessche, E. (1988) Structure and function of Leguminosae lectins, *Adv. in Lectin Res.*, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin Bd. **1**, S.73-134.

34. Lintermans, P. F., Bertels, A., Schlicker, C. *et al.* (1991) Identification, characterization, and nucleotide sequence of the F17-G gene, which determines receptor binding of *Escherichia coli* F17 fimbriae, *J. Bacteriol.* **173**, 3366-3373.

35. Teichberg, V. I., Silman, I., Beitsch, D. D., Resheff, G. (1975) A β-galactoside-binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1383-1387.

36. Raz, A., Zhu, D., Hogan, V., Shah, N., Raz, T., Karkash, R., Pizerini, R., Carmi, P. (1990) Evidence for the role of 34-kDa galactoside-binding lectin in transformation and metastasis, *Int. J. Cancer* **46**, 871-877.

37. Meromsky, L., Lotan, R., Raz, A. (1986) Implication of endogenous tumor cell surface lectins as mediators of cellular interactions and lung colonization, *Cancer Res.* **46**, 5270-5376.

38. Sanjuan, X., Fernandez, P. L., Castells, A., Castronovo, V., van den Brule, F. A., Liu, F. T., Cardesa, A., Campo, E. (1997) Differential expression of galectin-3 and galectin-1 in colorectal cancer progression, *Gastroenterology* **113**, 1906-1915.

39. Chiariotti, L., Berlingieri, M. T., De Rosa, P., Battaglia, C., Berger, N., Bruni, C. B., Fusco, A. (1992) *Oncogene* **7**, 2507-2511.

40. Jiang, P. H., Chany-Fournier, F., Sarragne, A., Gregoire, C., Chany, C. (1984) Detection of an interferon antagonist, sarcolectin, in human sarcomas and muscles, *Int. J. Cancer* **34**, 625-632.

41. Zeng, F. Y., Weiser, W. Y., Kratzin, H., Stahl, B., Karas, M., Gabius, H. J. (1993) The major binding protein of the interferon antagonist sarcolectin in human placenta is a macrophage migration inhibitory factor, *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 74-80.

42. Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M. (1993) Selectins, *J. Clin. Invest.* **91**, 379-387.

43. Lasky, L. A. (1992) Selectins-interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation, *Science* **258**, 964-969.

44. Varki, A. (1992) Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins, *Curr. Opinion Cell Biol.* **4**, 257-266.

45. Ashwell, G., Harford, J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver, *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 531-554.

46. Gabius, H. J. (1991) Detection and function of mammalian lectins - with emphasis on membrane lectins, *Biochim. Biophys. Acta* **1071**, 1-18.

47. André, S., Unverzagt, C., Kojima, S., Dong, X., Fink, C., Kayser, K., Gabius, H. J. (1998) Neoglycoproteins with synthetic complex biantennary nonasaccharide or its α2,3-/α2,6-sialylated derivatives: their preparation, the assessment of their ligand properties for purified lectins, for tumor cells in vitro and in tissue sections and their biodistribution in tumor-bearing mice, *Bioconj. Chem.* **8**, 845-855.

48. Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N. V., André, S., Gabius, S., Gabius, H. J. (2000) Endogenous lectins as targets for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* **43**, 225-244.

49. Gabius, S., Schirrmacher, V., Franz, H., Joshi, S. S., Gabius, H. J. (1990) Analysis of cell surface sugar receptor expression by neoglycoenzyme binding and adhesion to plastic-immobilized neoglycoproteins for related low and high metastatic cell lines of murine tumor model systems, *Int. J. Cancer* **46**, 500-507.

50. Gabius, H. J., André, S., Danguy, A., Kayser, K., Gabius, S. (1994) Presence and quantification of carbohydrate-binding sites on cell surfaces and in tissue sections by neoglycoproteins, *Methods Enzymol.* **242**, 37-46.

51. Gabius, H. J. (1988) Ein Gebiet im Schnittpunkt von Zuckerchemie, Biochemie, Zellbiologie und Onkologie, *Angew. Chem.* **100**, 1321-1330.

52. Rüdiger, H., Siebert, H. C., Solís, D., Jimenez-Barbero, J., Romero, A., von der Lieth, C. W., Díaz-Mauriño, T., Gabius, H. J. (2000) Medicinal Chemistry Based on the Sugar Code: Fundamentals of Lectinology and Experimental Strategies with Lectins as Targets, *Curr. Med. Chem.* **7**, 389-416.

53. Elstner, E. F., Oßwald, W., Schneider, I. (Herausg.) (1996), in: *Phytopathologie-Allgemeine und biochemische Grundlagen*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford.

54. Kolattukudy, P.E.,Rogers, L.M., Li, D.,Hwang, C., Flaishman, M.A (1995) Surface Signaling in Pathogenesis, *PNAS* **92**, 4080-4087.

55. Podila, G. K., Rogers, L. M., Kolattukudy P. E. (1993) Chemical Signals from Avocado Surface Wax Trigger Germination and Appressorium Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*,

Plant Physiol. **103,** 267-272.

56. Mendgen, K., Deising, H. (1993) Infection structures of fungal plant-pathogens- a cytological and physiological evaluation, *New Phytology* **124**, 193-213.

57. Wessels, J. G. H. (1996) The function of fungal hydrophobins in the *Cladosporium-fulvum*-tomato interaction, *Trends in Plant Science* **1**, 9-15.

58. Cooper, T. G. (1980) *Biochemische Arbeitsmethoden*, Walter de Gruyter & Co. Verlag, Berlin, New York.

59. Smith, P. K., Krohn, R. J., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. J. (1985) Measurement of protein using bicinchonic acid, *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.

60. Lottspeich, F., Zorbas, H. (Herausg.) (1998), in: *Bioanalytik,* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

61. Deutscher, M. P. (1990) *Protein Purification,* Academic Press, New York.

62. Doonan, S. (1996) *Protein Purification Protocols,* Humana Press.

63. Warburg, O., Christian, W. (1941) Isolierung und Kristallisation des Gärferments Enolase, *Biochem. Z.* **310**, 384-421.

64. Layne, E. (1957) Spectrophotometric methods for measuring proteins, *Methods Enzymol.* **3**, 447-454.

65. Kunze, U. R. (1990) *Grundlagen der quantitativen Analyse*, 3. neubearbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

66. Kirschenbaum, D. M. (1978) Molar absorptivity and $A_{1cm}^{1\%}$ values for proteins at selected wavelength of the ultraviolet and visible regions, *Anal. Biochem.* **90**, 309-330.

67. Ozolis, J. (1990) Amino acid analysis, *Methods Enzymol.* **182**, 587-601.

68. van den Hoogen, B. M., van Weeren, P. R., Lopes-Cardozo, M., van Golde, L. M. G., Barneveld, A., van de Lest, C. H. A. (1998) A microtiter plate assay for the determination of uronic acids, *Anal. Biochem.* **257**, 107-111.

69. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* **28**, 350-356.

70. Bélanger, R. R., Bowen, P. A., Ehret, D. L., Menzies, J. G. (1995) Soluble silicon - its role in crop disease management of greenhouse crops, *Plant Dis.* **79,** 329-336.

71. Jander, G., Blasius E. (1987) *Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum*, S. Hirzel Verlag, Stuttgart.

72. Engelhardt, G., Koller, H. (Herausg.) (1994), in: *NMR Basic Principles and Progress* **31**,

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

73. Boller, T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214.

74. Darvil, A. G., Albersheim, P. (1984) Phytoalexins and their elicitors - A defense against microbial infection in plants, *Annu. Rev. Plant Biology* **35**, 243-275.

75. Lamb, C. J., Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.

76. Peck, S. C., Nuhse, T. S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F., Boller, T. (2001) Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors, *Plant Cell* **13**, 1467-1475.

77. Kinoshita, T., Shimazaki, K. (1999) Characterization of cytosolic cyclophilin from guard cells of *Vicia faba L.*, *Plant Cell Physiol.* **40 (1)**, 53-39.

78. Ludwig, A., Boller, T. (1990) A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins, *FEMS Microbiol. Letters* **69**, 61-66.

79. Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A., Vanderleyden, J. (1990) An automatic quantitative assay for fungal growth inhibition, *FEMS Microbiol. Lett.* **69**, 55-60.

80. Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Terras, F. R. G., Proost, P., Van Damme, J., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Broekaert, W. F. (1992) Isolation and characterisation of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa L.* seeds, *J. Biol. Chem.* **226** , 228-233.

81. Torres-Londoño, P. (1997) Reinigung und Charakterisierung eines chitosanbindenden Faktors aus Erbsensamen (*Pisum sativum*) und seine Funktion bei der Abwehr phytopathogener Pilze, Dissertation, Würzburg.

82. Piñeiro, M.; Díaz, I.; Rodriguez-Palenzuela, P.; Titarenko, E.; García-Olmedo, F. (1995) Selective disulphide linkage of plant thionins with other proteins, *FEBS Lett.* **369**, 239-242.

83. Broekaert, W. F.; Terras, F.; Cammue, B.; Osborn, R. W., (1995) Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System, *Plant Physiol.* **108**, 1353-1358.

84. Thevissen, K.; Ghazi, A.; De Samblanx, G. W.; Brownlee, C.; Osborn, R. W.; Broekaert, W. F. (1996) Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins, *J. Biol. Chem.* **271**, 15018-15025.

85. Molina, A.; Segura, A.; García-Olmedo, F. (1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens, *FEBS Lett.* **316**, 119-122.

86. Lee, H. I.; Broekaert, W. F.; Raikhel, N. V., (1991) Co- and post-translational processing of the

hevein preproprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *J. Biol. Chem.* **266**, 15944-15948.

87. Cammue, B. P.; De Bolle, M. F.; Terras, F. R.; Proost, P.; Van Damme, J.; Rees, S. B.; Vanderleyden, V.; Broekaert, W. F., (1992) Isolation and characterisation of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa L.* seeds, *J. Biol. Chem.* **267**, 2228-2233.

88. García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., Rodríguez-Palenzuéla, P. (1998) Plant defense peptides, *Biopolymers (Peptide Science)* **47**, 479-491.

89. Xu, Q., Liu, Y., Wang, X., Gu, H., Chen, Z. (1998) Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*, *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 899-905.

90. Benhamou, N., Kloepper, J. W., Tuzum, S. (1998) Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response, *Planta* **204**, 153-168.

91. Zeng, C. M., Liao, J. L., Nakazato, K., Hjertén, S. (1996) Hydrophobic interaction chromatography of proteins on continuous beds derivatized with isopropyl groups, *J. Chromatogr.* **753**, 227-234.

92. Maurer, H. R. (1968) *Disk-Elektrophorese* (Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese), Walter de Gruyter & Co., Berlin.

93. Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.

94. Potuzník, V., Reissbrodt, R. (Herausg.) (1987), in: *Bakteriologische Nährmedien für die Medizinische Mikrobiologie*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

95. Nirenberg, H. (1994), Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, European Fusarium Seminar, Institut für Mikrobiologie, Berlin.

96. Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R. (Herausg.) (1987), in: *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*, Thieme Verlag, Stuttgart.

Lebenslauf

Persönliche Daten	Anschrift	Corina Barbara Böck Nusselstraße 57 81245 München Telefon: 0179/1451907 e-mail: corina.boeck@tiph.vetmed.uni-muenchen.de
	Heimatadresse	Marktplatz 6 97941 Tauberbischofsheim
	Geburtsdatum/ Geburtsort	04.12.1970 / Tauberbischofsheim
	Religionszugehörigkeit	katholisch
	Familienstand	ledig
	Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulausbildung	1977 - 1981	Grundschule in Tauberbischofsheim
	1981 - 1990	Matthias-Grünewald-Gymnasium in Tauberbischofsheim
	05/1990	Allgemeine Hochschulreife
Universitätsausbildung	11/1990 - 02/1991	Universität Würzburg, Studium der Chemie
	05/1991 - 07/1995	Universität Würzburg, Studium der Pharmazie
	10/1995 - 10/1996	Praktisches Jahr, Burg Apotheke in Gössenheim
	12/1996	Approbation
	01/1997 - 10/2000	Universität Würzburg, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Promotionsstudium, Arbeitskreis Prof. Dr. H. Rüdiger, Apothekenchefvertretungen in Teilzeit
	05/1999 – 09/1999	Italienisch für Anfänger
	seit 10/2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Ludwig-Maximilians-Universität München
Hobbies/ Interessen		Fremdsprachen, Kunst und Kultur, Sport, Reisen

München, 18. November 2002