

Protokoll zum Fachkurs

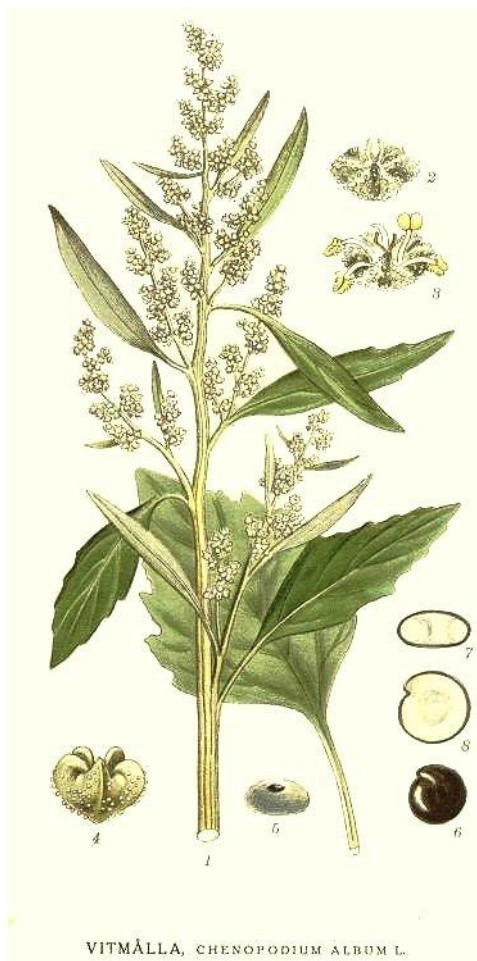
Zellwandeigenschaften und Zellwandfunktion

Till Biskup

Matrikel-Nr. 155567

WS 2001/2002

HU Berlin



VITMÄLLA, CHENOPodium ALBUM L.

URL: <http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/~lindman/351.jpg>

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1 Einfluß der Borsäure auf die Menge an fest gebundenem Calcium in der ethanolunlöslichen Substanz von Zellkulturen	2
1.1 Einleitung	2
1.2 Material und Methoden	2
1.3 Berechnungen	3
1.4 Ergebnisse	4
1.5 Diskussion	5
1.6 Ausblick	5
2 Herstellung eines borfreien entproteinierten Zellwandpräparates und Bestimmung des Wassergehalts nach Quellung in einer 3%igen Dextranlösung	6
2.1 Einleitung	6
2.2 Material und Methoden	6
2.3 Berechnungen	7
2.4 Ergebnisse und Diskussion	8
3 Wirkung von EDTA auf die Menge an fest gebundenem Calcium in der ethanol-unlöslichen Substanz der Zellkultur	9
3.1 Fragestellung	9
3.2 Material und Methoden	9
3.3 Berechnungen	11
3.4 Ergebnisse	14
3.5 Diskussion	14
3.6 Ausblick	15
Literaturverzeichnis	16

Tabellenverzeichnis

1.1 Gemessene Calciumkonzentration in Zellwänden von <i>Chenopodium album</i> nach verschiedenen Extraktionsschritten in An- und Abwesenheit von Borsäure.	3
1.2 Frisch- und Trockenmassen der ethanolunlöslichen Substanz unzerstörter Zellcluster einer Suspensionskultur von <i>Chenopodium album</i> (in mg).	4
1.3 Calciumgehalt der Zellwände von <i>Chenopodium album</i> nach verschiedenen Extraktionsschritten in An- und Abwesenheit von Borsäure.	4
1.4 Calciumgehalt der Zellwände von <i>Chenopodium album</i> nach verschiedenen Extraktionsschritten in An- und Abwesenheit von Borsäure in Anteilen des ursprünglichen Calciumgehaltes.	5
2.1 Optische Drehwinkel der Dextran-Lösungen der Zellwandpräparate in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Bor.	7
2.2 Wassergehalt der borfreien und borhaltigen Zellwand-Präparate nach Quellung in einer 3%igen Dextranlösung.	8
3.1 Natrium-EDTA-Konzentration, Zusammensetzung und Konzentration freier Calcium-Ionen der Inkubations- und Waschlösungen.	9
3.2 Frisch- und Trockenmassen der ethanolunlöslichen Substanz unzerstörter Zellcluster einer Suspensionskultur von <i>Chenopodium album</i> (in mg).	10
3.3 Calcium-Konzentration in den Wasch- und Inkubationslösungen.	11
3.4 Calciumgehalt der Zellwände von <i>Chenopodium album</i> nach verschiedenen Extraktionsschritten in Abhängigkeit von der Konzentration des Natrium-EDTA.	13

Abbildungsverzeichnis

3.1 Calcium-Gehalt der Zellwände im Gleichgewicht mit borhaltigen EDTA-Lösungen.	14
--	----

Einleitung

Wachsende Pflanzenzellen sind von einer primären Zellwand umgeben, die aus einer komplexen Mischung aus Cellulose–Mikrofibrillen besteht, die nichtkovalent an eine Matrix aus Hemicellulosen, Pektinen und Strukturproteinen gebunden sind (Cosgrove, 1997). Zur Zeit viel diskutiert wird die Möglichkeit, daß auch kovalente Bindungen (cross–links) zwischen Polysacchariden der Zellwand bestehen (Carpita and Gibeaut, 1993). Der zwingende Beweis ihrer Existenz steht jedoch noch aus.

Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang dem Pektin–Polysaccharid Rhamnogalacturonan II (RG II) zu. Seine Struktur ist — obwohl es sich um ein Polysaccharid und nicht um ein Protein handelt — in den pflanzlichen Primärwänden hochkonserviert (O'Neill et al., 1990). RG II kommt in den Zellwänden überwiegend als Dimer vor, dessen Monomere durch eine Boratester–Bindung kovalent verknüpft sind (Ishii et al., 1999; Kobayashi et al., 1996; O'Neill et al., 1996).

Diese Entdeckungen haben dazu geführt, eine wesentliche physiologische Rolle des Bors in der Pflanze in der Knüpfung dieser kovalenten Bindungen zu sehen. Bor, eigentlich ein Mikronährstoff, kommt in Zellwänden in Konzentration von bis zu 10 μ M vor und liegt damit in diesen Bereichen an der Grenze zum Makroelement.

Eine chemische Besonderheit der Borsäure ist ihre Fähigkeit, in wässriger Umgebung spontan Ester zu bilden. Diese Boratester sind bei hohen pH–Werten stabil und zerfallen bei niedrigem pH. Ihre Bildung erfolgt mit einer sehr hohen Geschwindigkeitskonstante, so daß sich das Gleichgewicht binnen Minuten einstellt.

Die Stabilität der Boratester in der pflanzlichen Zellwand wird durch zwei Faktoren beeinflusst. Das ist zum einen der an der Bindung beteiligte Zuckerligand Apiose. Ein einzelnes Boratester–Molekül verknüpft wahrscheinlich zwei der vier Apiosyl–Seitengruppen des Rhamnogalacturonan–Dimers (dRG–II–B) (Ishii and Matsunaga, 1996; O'Neill et al., 1996; Pellerin et al., 1996). Diese Boratester–Bindung an Apiose ist *in vitro* bis pH 4–3 stabil. *In muro* konnte dagegen eine Stabilität bis pH 2.5 gezeigt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß es weitere Faktoren gibt, die die Stabilität des Borat–Esters in der pflanzlichen Zellwand beeinflussen. Man geht davon aus, daß die Stabilität der Esterbindung *in muro* durch die Gegenwart fest komplexierter Calcium–Ionen erhöht wird (Kobayashi et al., 1996; Matoh and Kobayashi, 1998; Kobayashi et al., 1999; Ehwald et al., 2002).

Das so gebundene Calcium ist das stabilst gebundene Calcium, das in der Zelle bisher gefunden wurde. Ein Schwerpunkt der folgenden Versuche lag auf der Untersuchung des wechselseitigen Einflusses von Bor– und Calcium–Gehalt in den Primärwänden einer *Chenopodium album*–Kultur.

1 Einfluß der Borsäure auf die Menge an fest gebundenem Calcium in der ethanol-unlöslichen Substanz von Zellkulturen

1.1 Einleitung

Lange Zeit war die physiologische Bedeutung des Mikroelementes Bor unklar. Vor etwa zehn Jahren entdeckten MATOH und Kollegen (Matoh et al., 1993; Kobayashi et al., 1996), daß die überwiegende Mehrheit des sich in den Zellwänden höherer Pflanzen befindenden Bors in Form von Borsäure-Estern vorliegt. Diese Ester verknüpfen kovalent zwei Ketten des Pectin-Bestandteils Rhamnogalacturonan II zu einem Dimer (dRG-II-B). Neuere Erkenntnisse (Kobayashi et al., 1999) zeigen, daß Calcium eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung und Stabilität der dRG-II-B Moleküle spielt.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde der Frage nachgegangen, in welcher Weise die Menge des fest gebundenen Calciums von der Borversorgung der Zellen abhängt. Ferner wurde der Einfluß der EDTA-Konzentration und der Konzentration der Borsäure in der EDTA-Lösung auf die Ablösbarkeit des fest gebundenen Calciums untersucht.

1.2 Material und Methoden

Lösungen

- 500 ml 100 mM NaCl pH 3.5 mit Citronensäure eingestellt
- 250 ml 1 mM EDTA ohne Bor
- 250 ml 1 mM EDTA + 1 mM Bor
- 250 ml 10 mM EDTA ohne Bor
- 250 ml 10 mM EDTA + 1 mM Bor
- 1000 ml 10 mM NaCl, borfrei
- 250 ml 100 mM HCl, borfrei
- 50 ml Ca Standard 50 μ M

Geräte

- Heraeus Sepatech Suprafuge 22 mit Rotor HSA 7.290
- Perkin Elmer Atomic Absorption Spectrometer 3110 (AAS)

Präparation der Zellen

Ethanolextrahierte Zellen (ethanolunlösliche Substanz) von borhaltigen und borfreien Kulturen von *Chenopodium album* wurden vergleichend hinsichtlich ihres Calcium-Gehaltes in Abhängigkeit vom Borgehalt untersucht. Dabei wurden beide Kulturen parallel und identisch behandelt.

Ablösen des schwach gebundenen Calciums Die Zellen wurden auf einer Fritte mit dem fünf-fachen Packungsvolumen einer 100 mM NaCl-Lösung (pH 3.5, mit Citronensäure eingestellt) gewaschen. Diese kurze Säure-Behandlung löst das nur schwach gebundene Calcium aus den Zellen. Anschließend wurden je 0.5 g Probe für die Blindwerte sowie zwei Proben definierte Menge für die Trockenmassebestimmung entnommen. Alle Proben wurden als Doppelbestimmung vorbereitet und gemessen.

Auf die Proben für die Blindwerte der Calcium-Bestimmung (ohne EDTA-Behandlung) wurden 10 ml 100 mM HCl gegeben und anschließend geschüttelt (1 h). Danach wurden die Zellen sedimentiert (Zentrifuge, kleine Röhrchen, 3000 rpm, decel 2, 15 min) und im abgenommenen Überstand die Calcium-Konzentration gemessen.

Calcium-Extraktion durch EDTA Jeweils 0.5 g der Zellen aus borhaltiger und borfreier Kultur wurden in vier verschiedenen Lösungen (EDTA-Konzentration 1 und 10 mM, Borsäure-Konzentration 0 und 1 mM, alle Lösungen bei pH 7, mit NaOH eingestellt) jeweils als Doppelbestimmung inkubiert (über Nacht auf dem Schüttler). EDTA extrahiert dabei je nach Konzentration und Gegenwart von Borsäure in unterschiedlichem Umfang das fest an die Zellwand gebundene Calcium.

Anschließend wurden alle Proben kurz mit 10 mM NaCl gewaschen (Zentrifuge, 6500 rpm, decel 2, 5 min) und danach mit 10 ml 100 mM HCl versetzt, geschüttelt (1 h), sedimentiert (Zentrifuge, kleine Röhrchen, 3000 rpm, decel 2, 15 min) und der Calcium-Gehalt im abgenommenen Überstand bestimmt.

Calcium-Bestimmung

Die Bestimmung der Menge des verbliebenen Calciums in der ethanollöslichen Substanz erfolgte mittels Flammenemissionsanalyse am Atomabsorptions-Spektrometer (N₂O–Acetylen-Flamme). Das Gerät wurde dabei mit einem 50 μ M Ca-Standard und Reinstwasser als Nullwert kalibriert.

Tabelle 1.1: Gemessene Calciumkonzentration in Zellwänden von *Chenopodium album* nach verschiedenen Extraktionsschritten in An- und Abwesenheit von Borsäure. Gemessen wurde der Calciumgehalt im HCl-Überstand nach Extraktion durch 100 mM HCl.

Extraktionsbehandlung		Ca-Konzentration (μ M) des HCl-Überstandes der ethanolextrahierten Zellcluster					
		borfreie Anzucht			normale Anzucht (100 μ M Borsäure)		
1.	100 mM CaCl (pH 3.5)	14.92	15.20		29.69	27.38	
2.	wie 1., anschließend 1 mM EDTA, 1 mM B	4.78	5.29	3.51	15.82	13.07	16.85
3.	wie 1., anschließend 1 mM EDTA	3.65	6.34		4.42		
4.	wie 1., anschließend 10 mM EDTA, 1 mM B	4.97			3.94	5.17	
5.	wie 1., anschließend 10 mM EDTA	6.97	3.62		3.29	4.10	

1.3 Berechnungen

Stoffmenge an Calcium Die Flammenemissionsanalyse am AAS liefert als Wert direkt die Konzentration $[\text{Ca}]_{\text{Probe}}$ an Calcium in der Probe (in μ M). Aus diesen Calcium-Konzentrationen kann bei bekanntem Probenvolumen V_{Probe} die Stoffmenge n_{Ca} an Calcium nach der Gleichung

$$n_{\text{Ca}} = ([\text{Ca}]_{\text{Probe}} - [\text{Ca}]_{\text{HCl}}) \cdot V_{\text{Probe}} \quad [n_{\text{Ca}}] = \mu\text{mol}$$

mit

$$[\text{Ca}]_{\text{HCl}} = 1.27 \mu\text{M} \quad V_{\text{Probe}} = 0.01 \text{ l}$$

bestimmt werden. Dabei ist $[\text{Ca}]_{\text{HCl}}$ die Calcium-Konzentration des Blindwertes (ohne EDTA-Behandlung). Wird diese Stoffmenge auf eine definierte Trockenmasse m_{T} (in diesem Fall $m_{\text{T}} = 1 \text{ g}$) bezogen, erhält man die spezifische Calcium-Konzentration n_{Ca}^{S}

$$n_{\text{Ca}}^{\text{S}} = \frac{([\text{Ca}]_{\text{Probe}} - [\text{Ca}]_{\text{HCl}}) \cdot V_{\text{Probe}}}{m_{\text{T}}(\text{Probe})} \quad [n_{\text{Ca}}^{\text{S}}] = \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$$

bezogen auf 1 g der Trockenmasse m_{T} . Für die Werte für die Trockenmassen $m_{\text{T}}(\text{Probe})$ der Proben vgl. Tab. (1.2).

Tabelle 1.2: Frisch- und Trockenmassen der ethanolunlöslichen Substanz unzerstörter Zellcluster einer Suspensionskultur von *Chenopodium album* (in mg).

	Frischmasse m_F / mg	Trockenmasse m_T / mg	m_T pro 0.5 g m_F m_T^S / mg	
borfreie Anzucht	250	9.6	19.2	19.7
	136	5.5	20.2	
normale Anzucht	219	10.7	24.4	24.4
	318	15.5	24.4	

Anteil des vorhandenen Calciums an fest gebundenem Calcium Für Aussagen über den Zusammenhang zwischen Boratveresterung und Calcium-Gehalt der Zellwände ist es sehr hilfreich, den Anteil (A_{Ca}) des nach EDTA-Behandlung verbleibenden Calciums in der Zellwand am vorher in der Zellwand fest gebundenen Calcium zu kennen. Er berechnet sich nach der Gleichung

$$A_{Ca} = \frac{n_{Ca}^S(\text{Probe})}{\bar{n}_{Ca}^S(\text{Blindwert})} \quad [A_{Ca}] = \%$$

aus den spezifischen Calcium-Stoffmengen n_{Ca}^S von Probe und Blindwert. Für die Blindwerte wurde dabei auf die Mittelwerte $\bar{n}_{Ca}^S$ zurückgegriffen.

1.4 Ergebnisse

Im vorliegenden Versuch wurde der Calciumgehalt der Zellwände von *Chenopodium album* nach verschiedenen Extraktionsschritten in An- und Abwesenheit von Borsäure untersucht. Dabei zeigte sich, daß bei borfrei angezogenen Zellen, die im Vergleich zur normalen Kultur schon zu Beginn einen niedrigeren Calcium-Gehalt der Zellwände aufwiesen, das Calcium durch Inkubation mit EDTA mehr oder weniger unabhängig von dessen Konzentration fast vollständig aus der Zellwand herausgelöst wurde.

Tabelle 1.3: Calciumgehalt der Zellwände von *Chenopodium album* nach verschiedenen Extraktionsschritten in An- und Abwesenheit von Borsäure.

Extraktionsbehandlung		Restlicher Ca-Gehalt ($\mu\text{mol} / \text{g TM}$) der ethanolextrahierten Zellcluster					
		borfreie Anzucht			normale Anzucht (100 μM Borsäure)		
1.	100 mM NaCl (pH 3.5)	6.93	7.07		11.65	10.70	
2.	wie 1., anschließend 1 mM EDTA, 1 mM B	1.78	2.04	1.14	5.96	4.84	6.39
3.	wie 1., anschließend 1 mM EDTA	1.21	2.57		1.29		
4.	wie 1., anschließend 10 mM EDTA, 1 mM B	1.88			1.09	1.60	
5.	wie 1., anschließend 10 mM EDTA	2.89	1.19		0.83	1.16	

Bei normal angezogenen Zellen zeigte sich, daß bei Inkubation mit 1 mM EDTA-Lösung die Anwesenheit von Bor (1 mM) signifikant die Extraktion des Calciums aus der Zellwand verringern konnte. Dieser Effekt des Bors war dagegen bei erhöhter EDTA-Konzentration (10 mM) nicht mehr

vorhanden. Deutlich erkennbar werden die beschriebenen Tendenzen bei der Darstellung des nach der Inkubation mit EDTA in der Zellwand verbliebenen Calciums als Anteil vom ursprünglichen Calcium-Gehalt der Zellwand (vgl. Tab. (1.4)).

Tabelle 1.4: Calciumgehalt der Zellwände von *Chenopodium album* nach verschiedenen Extraktionsschritten in An- und Abwesenheit von Borsäure in Anteilen des ursprünglichen Calciumgehaltes.

Extraktionsbehandlung	Restlicher Ca-Gehalt (in %) der ethanolextrahierten Zellcluster					
	borfreie Anzucht			normale Anzucht (100 μ M Borsäure)		
1. 100 mM NaCl (pH 3.5)	100			100		
2. wie 1., anschließend 1 mM EDTA, 1 mM B	25	29	16	53	43	57
3. wie 1., anschließend 1 mM EDTA	17	37		12		
4. wie 1., anschließend 10 mM EDTA, 1 mM B	27			10	14	
5. wie 1., anschließend 10 mM EDTA	41	17		7	10	

1.5 Diskussion

Ziel des Versuches war, zu klären, ob die Menge des fest gebundenen Calciums mit der Borat-Veresterung des RG-II, d.h. mit der Menge an dRG-II-B, zusammenhängt. Aufgrund der Datenlage können nur Tendenzen erkannt werden: Bei normaler Anzucht (mit Bor) kann die Zugabe von Bor (1 mM) zu einer schwach konzentrierten Lösung (1 mM) des Calcium-Chelators EDTA eine Extraktion des Calciums aus der Zellwand deutlich verringern. Bei einer stärkeren Konzentration von EDTA wirkt sich die Zugabe von Bor nicht mehr signifikant aus.

Auch wenn die Tendenzen aufgrund der Daten eindeutig zu sein scheinen, ist bei der geringen Zahl der Werte auch ein systematischer Fehler nicht auszuschließen. Klarheit kann hier nur durch weitere Versuche geschaffen werden.

Auf den ersten Blick ein wenig verwunderlich ist, warum die borfreie Kultur keinen Effekt auf die Zugabe von Bor mit der EDTA-Lösung zeigte. Eine mögliche Erklärung ist die sehr langsame Bildung des Dimers dRG-II-B, auf die aufgrund der langsamen Dissoziation des dRG-II-B (vgl. Ehwald et al., 2002) geschlossen werden kann. Vermutlich ist Bor beim Binden in Gegenwart von EDTA zu langsam, um im vorliegenden Versuch bei den verhältnismäßig kurzen Inkubationszeiten (über Nacht) zu signifikanten Effekten zu führen. Diese Hypothese müßte durch weitere Versuche mit längeren Inkubationszeiten überprüft werden.

Ein eindeutiges Ergebnis des Versuches ist aber die Feststellung, daß die Affinität von dRG-II-B zu Calcium wesentlich stärker ist als jene des EDTA.

1.6 Ausblick

Die vorliegenden Daten lassen grundsätzlich zwei Richtungen weiterer Experimente sinnvoll erscheinen: Zum einen sollte die Zeitkinetik der Ca-Herauslösung aus der Zellwand untersucht werden. Des weiteren sollte der Versuch mit einer feiner gestuften Konzentrationsreihe des EDTA wiederholt werden, um so Erkenntnisse über die Konzentrationskinetik der Ca-Herauslösung aus der Zellwand zu erhalten. Für normal (mit Bor) angezogene Zellkulturen von *Chenopodium album* wurde dies im dritten Versuch durchgeführt.

2 Herstellung eines borfreien entproteinierten Zellwandpräparates und Bestimmung des Wassergehalts nach Quellung in einer 3%igen Dextranlösung

2.1 Einleitung

Der größte Teil des Mikroelements Bor, der in den Zellwänden höherer Pflanzen vorkommt, liegt als Borsäureester vor, der zwei Ketten des Pektin–Polysaccharids Rhamnogalacturonan II (dRG–II–B) kovalent miteinander verknüpft (Matoh et al., 1993; Kobayashi et al., 1996). Zusammen mit Untersuchungen der mechanischen Stabilität und die Porenstruktur pflanzlicher Zellwände, insbesondere beim Übergang von Zellkulturen in die stationäre Phase (Fleischer et al., 1998, 1999), deuten diese Befunde auf eine wichtige Rolle des Bors für die Stabilisierung der pflanzlichen Zellwand hin.

Das führte zu der Überlegung, daß Zellwand–Präparate, die zuvor borfrei gemacht wurden, ein größeres Quellungsvermögen als normale (borhaltige) Zellwände aufweisen sollten. Diese Fragestellung wurde im folgenden untersucht.

2.2 Material und Methoden

Lösungen

- 500 ml 0.1 M Na_2HPO_4 , pH 6.5 mit HCl eingestellt
- 250 ml 0.1 M NaCl / 1 mM CaCl_2
- 500 ml 10 mM NH_4HCO_3 , borfrei
- 100 ml 20 mM Schwefelsäure
- 100 ml 3% Dextran, borfrei

Geräte

- Ultraschall–Stab
- Heraeus Sepatech Suprafuge 22 mit Rotor HSA 7.290
- Polarimeter

Herstellung eines borfreien entproteinierten Zellwandpräparates

Das Zellwandpräparat wurde aus den ethanolgesättigten Zellclustern einer Suspensionskultur (*Chenopodium album*) hergestellt.

Aufbrechen der Zellstruktur 20 ml der ethanolfeuchten Masse, 10 g Natriumchlorid (Kristalle zur mechanischen Zerstörung der Zellen) und 0.1 g Calciumchlorid (zur Stabilisierung der Zellwand) werden mit 50 ml Ethanol (96%) versetzt und geschüttelt. Je 20 ml dieser Suspension werden mit dem Ultraschallstab behandelt (10 min). Zur Verhinderung der Erwärmung der Lösung wird die Zerkleinerung in einem Becherglas im Wasserbad durchgeführt. Anschließend wurde unter dem Mikroskop auf noch intakte Zellen kontrolliert (10 min Behandlung ausreichend). Alle Portionen wurden vereinigt.

Abtrennen der Zellwände und enzymatische Entfernung von Protoplasmaresten Die Masse wird durch Zentrifugation von Ethanol befreit und in Wasser überführt (auf 2 Röhrchen verteilen, 3x mit Wasser zentrifugieren, 6500 rpm, 10 min) und anschließend 1x mit dem Standardpuffer für das Pankreaspräparat “Trypsin zur Zellzucht” (Na_2HPO_4) zentrifugiert (2000 rpm, 10 min, Überstand verworfen). Anschließend Aufnahme in 80 ml des Standardpuffers und Zugabe von 100 mg des Enzymgemisches (enthält Proteasen, Nucleasen, Amylasen). Inkubation über Nacht.

Entfernen der Borsäureester aus dem RG–II Die Zellwände wurden 2x mit 0.1 M NaCl und 1 mM CaCl₂ zentrifugiert und in dem gleichen Medium aufgenommen. Eine Hälfte der Suspension wurde zentrifugiert (*Heraeus Sepatech Suprafuge* 22, 6500 rpm, accel. 9, decel. 2, 5 min), 2x auf der Zentrifuge mit borfreier 10 mM NH₄HCO₃ gewaschen und im Zentrifugenbecher lyophilisiert.

Die andere Hälfte wurde ebenfalls zentrifugiert und in H₂SO₄ (20 mM, 35 ml) aufgenommen und geschüttelt (4 h). Danach Abtrennung der H₂SO₄ durch Zentrifugation und Waschen mit borfreier entionisierter 10 mM NH₄HCO₃ (6500 rpm, accel. 9, decel. 2, 3x5 min). Anschließend wurde das Sediment im Zentrifugenbecher lyophilisiert.

Quellung

Je 25 mg des Lyophilisates wurden mit 5 ml einer 3%igen borfreien Lösung von Dextran T–250 in Wasser suspendiert (5 min auf dem Schüttler) und zentrifugiert (3000 rpm, accel 9, decel 2, 1x10 min, 1x15 min). Der Überstand (≥ 2.5 ml) wurde dekantiert und erneut zentrifugiert (3000 rpm, accel 9, decel 2, 10 min). Der Drehwinkel der Ausgangslösung und der Überstände wurde am Polarimeter gemessen. Die Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt (je 2x borhaltig und borfrei)

Tabelle 2.1: Optische Drehwinkel der Dextran–Lösungen der Zellwandpräparate in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Bor. Gemessen wurde die Dextran–Ausgangslösung sowie die Überstände der Lösungen, mit denen die Zellwandpräparate inkubiert worden waren.

Probe	Trockenmasse (mg)		Drehwinkel φ_D (°)		mittlerer Drehwinkel $\bar{\varphi}_D$ (°)	
Dextran			14.192			
borhaltiges Zellwandpräparat	24.7 25.0	24.85	14.661 14.634	14.670 14.633	14.6655 14.6335	14.6495
borfreies Zellwandpräparat	24.8 25.4	25.10	14.895 14.918	14.922 14.917	14.9085 14.9175	14.9130

2.3 Berechnungen

Dem Versuch liegt die Annahme zugrunde, daß die Dextran–Konzentration c_D proportional dem im Polarimeter gemessenen Drehwinkel φ_D ist:

$$c_D \propto \varphi_D$$

Unter der Annahme, daß die Dextran–Moleküle nicht in die Zellwand eindringen, kann daher das Quellungsvolumen V_Q wie folgt berechnet werden:

$$V_Q = V_D - \frac{\varphi_D(\text{Stammlösung}) \cdot V_D}{\bar{\varphi}_D(\text{Probe})} \quad [V_Q] = \text{ml}$$

Hierbei ist $\varphi_D(\text{Stammlösung})$ der Drehwinkel der Dextran T–250–Lösung, V_D das pro Probe eingesetzte Volumen der Dextran–Lösung und $\bar{\varphi}_D(\text{Probe})$ der Mittelwert der gemessenen Drehwinkel für die jeweilige Probe. Das so erhaltene Quellungsvolumen V_Q kann jetzt noch auf die Trockenmasse $m_T(\text{Probe})$ bezogen werden. Man erhält dadurch das spezifische Quellungsvolumen V_Q^S

$$V_Q^S = \frac{V_Q}{m_T(\text{Probe})} \quad [V_Q^S] = \text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$$

oder alternativ den spezifischen Wassergehalt $m_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{S}}$ der gequollenen Zellwände

$$m_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{S}} = \frac{V_{\text{Q}} \cdot \rho_{\text{H}_2\text{O}}}{m_{\text{T}}(\text{Probe})} \quad [m_{\text{H}_2\text{O}}] = \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$$

mit der Dichte von Wasser $\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1$. Der einzige Unterschied besteht in den Einheiten beider Größen.

2.4 Ergebnisse und Diskussion

Ausgehend von der Tatsache, daß der überwiegende Teil des Bors in der Zellwand höherer Pflanzen als Borat-Ester vorliegt, der zwei Ketten von Rhamnogalacturonan II (dRG-II-B) kovalent miteinander verbindet (Matoh et al., 1993; Kobayashi et al., 1996) und so zur Vernetzung des Pectins beiträgt, liegt die Vermutung nahe, daß die Quellfähigkeit der Zellwände durch die Entfernung des Bors erhöht werden kann.

Tabelle 2.2: Wassergehalt der borfreien und borhaltigen Zellwand-Präparate nach Quellung in einer 3%igen Dextranlösung.

	Wassergehalt (ml/g)	
unbehandelt (borhaltig)	6.54	6.03
behandelt (borfrei)	9.69	9.57

Diese Hypothese wurde durch den vorliegenden Versuch eindrucksvoll bestätigt. Die bei der Quellung aufgenommene Menge an Wasser liegt bei den borfreien Zellwänden etwa um die Hälfte höher als bei den nichtsäurebehandelten (borhaltigen) Ansätzen (vgl. Tab. (2.2)). Beide Ansätze waren unter den gegebenen Bedingungen maximal gequollen.

3 Wirkung von EDTA auf die Menge an fest gebundenem Calcium in der ethanol-unlöslichen Substanz der Zellkultur

3.1 Fragestellung

Nachdem im ersten Versuch bereits festgestellt worden war, daß eine Konzentration von 1 mM EDTA nicht ausreicht, um den größten Teil des in der Zellwand der ethanolunlöslichen Substanz von *Chenopodium album*-Kulturen gebundenen Calciums zu extrahieren, aber eine zehnfach höhere Konzentration an EDTA (10 mM) dies vermochte, wurde im Folgenden untersucht, ab welcher EDTA-Konzentration Calcium vollständig aus der Zellwand herausgelöst wird.

3.2 Material und Methoden

Der Versuch ist im Wesentlichen eine Fortführung des ersten Versuches. Die wesentlichen Unterschiede zu Versuch 1 sind:

- Zur genaueren Bestimmung des Ca-Gehaltes wurde in den Lösungen 1 und 2 der Ca-Gehalt bestimmt und auf eine definierte Konzentration (10 μ M) eingestellt.
- Es wurden keine "borfreien" Kulturen und Lösungen verwendet.

Lösungen

- 1500 ml Lösung 1
1 mM NaCl, 10 mM Natriumcitrat, 1 mM Bor
pH 7 mit HCl eingestellt
- 1000 ml Lösung 2
1 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM Bor
pH 7 mit NaOH eingestellt
- 100 ml 10 mM CaCl₂
für den Standard
- 1000 ml 1 mM NaCl
als Blindwert zur Ca-Messung
- 100 ml Ca-Standard
1 mM NaCl / 20 μ M CaCl₂

Tabelle 3.1: Natrium-EDTA-Konzentration, Zusammensetzung und Konzentration freier Calcium-Ionen der Inkubations- und Waschlösungen. Die Konzentration freier Calcium-Ionen wurde nach dem Massenwirkungsgesetz aus der Natrium-EDTA-Konzentration bei bekannter Dissoziationskonstante bei pH 7.0 errechnet.

EDTA-Konzentration (mM)	Volumen von Lsg. 1 pro Probe (ml)	Volumen von Lsg. 2 pro Probe (ml)	Konzentration der freien Ca-Ionen (pM)
0.0	40	0	10 ⁷
1.0	36	4	506
2.5	30	10	201
5.0	20	20	100
7.5	10	30	67
9.0	4	36	56

Geräte

- Heraeus Sepatech Suprafuge 22 mit Rotor HSA 7.290
- Perkin Elmer Atomic Absorption Spectrometer 3110 (AAS)

Präparation der Zellen

Entfernung des austauschbaren Calciums Zellcluster einer borhaltigen Zellkultur von *Chenopodium album* wurden zur Entfernung des austauschbaren Calciums in einer calciumfreien NaCl-Lösung (100 mM, pH 3.5, mit Citronensäure eingestellt) gewaschen (fünffaches Packungsvolumen). Anschließend wurden zwei Proben zur Trockenmassebestimmung entnommen, gewogen und bei 105°C für 24 h im Trockenschrank getrocknet.

Tabelle 3.2: Frisch- und Trockenmassen der ethanolunlöslichen Substanz unzerstörter Zellcluster einer Suspensionskultur von *Chenopodium album* (in mg).

Frischmasse m_F / mg	Trockenmasse m_T / mg	Trockenm. pro 0.5 g Frischm. m_T^S / mg	
730	33.0	11.3	10.5
396	15.4	9.7	

Calcium-Extraktion durch EDTA Definierte Mengen des Zellmaterials (0.5 g Frischmasse) wurden mit je 40 ml verschiedener Versuchslösungen über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Versuchslösungen hatten den gleichen pH-Wert (pH 7.0), die gleiche CaCl_2 -Konzentration (10 μM) und die gleiche Borsäurekonzentration (1 mM). Sie unterscheiden sich lediglich in der EDTA-Konzentration. Die Herstellung erfolgte durch Mischung zweier Stammlösungen (Lsg. 1 und Lsg. 2) gemäß Tab. (3.1)

In beiden Stammlösungen wurde durch vorherige Messung des Calcium-Gehaltes am AAS eine definierte Calcium-Konzentration ($[\text{Ca}]_{\text{soll}} = 10 \mu\text{M}$) durch Zugabe eines errechneten Volumens (V_{soll})

$$V_{\text{soll}} = \frac{V_{\text{ist}} \cdot ([\text{Ca}]_{\text{soll}} - [\text{Ca}]_{\text{ist}})}{[\text{Ca}]_{\text{Standard}}}$$

an CaCl_2 ($[\text{Ca}]_{\text{Standard}} = 10 \text{ mM}$) möglichst genau eingestellt. Durch Einstellung der Calcium-Konzentration ist die Konzentration der freien Calcium-Ionen in diesen Lösungen mittels Massenwirkungsgesetz möglich (vgl. Tab. (3.1)).

Das EDTA in der Lösung extrahierte dabei je nach Konzentration das fest gebundene Calcium aus der Zellwand. Nach der Inkubation wurden die Proben sedimentiert (Zentrifuge, 6500 rpm, decel 2, 5 min) und danach alle Ansätze zweifach mit ihrer jeweiligen Inkubationslösung gewaschen (Zentrifuge, 6500 rpm, decel 2, 5 min, danach 1 min absetzen lassen¹).

Calcium-Extraktion durch HCl Nach dem Waschen wurden die Zellen zur Erfassung Gehaltes an Calcium mit HCl (10 ml, 100 mM) extrahiert (Schüttler, 1 h) und anschließend sedimentiert (kleine Röhrchen, 3000 rpm, decel 2, 15 min). Für die Calcium-Bestimmung wurde der (abgenommene) Überstand verwendet.

Calcium-Bestimmung

Die Bestimmung der Menge des verbliebenen Calciums in der ethanollöslichen Substanz erfolgte mittels Flammenemissionsanalyse am Atomabsorptions-Spektrometer (N_2O -Acetylen-Flamme). Das Gerät wurde dabei mit einem 50 μM Ca-Standard (50 μM Ca / 1 mM NaCl / 0.1 M HCl) und Reinstwasser als Nullwert kalibriert. Außerdem wurde für jede Inkubationslösung der Calcium-Gehalt bestimmt (vgl. Tab. (3.3)).

¹Die Zellen ließen sich durch die Zentrifugation trotz langsamer Bremse nicht einwandfrei sedimentieren

Tabelle 3.3: Calcium-Konzentration in den Wasch- und Inkubationslösungen. Wasch- und Inkubationslösungen wurden getrennt angesetzt und daher beide gemessen. Für die weitere Verrechnung sind nur die Calcium-Konzentrationen in den Waschlösungen von Interesse.

EDTA-Konzentration (mM)	Ca-Konzentration in den Inkubationslösungen (ml)	Ca-Konzentration in den Waschlösungen (ml)	
0.0	14.37	14.04	
1.0	16.32	16.84	
2.5	19.89	27.80	26.45
5.0	15.50	13.80	
7.5	16.17	20.27	
9.0	19.54	15.14	

3.3 Berechnungen

Trockenmassen Zur Bestimmung der Trockenmassen wurden zwei kleine Keramikgefäße leer und mit der Probe Frischmasse gewogen und daraus die eingesetzte Frischmasse m_F als Differenz errechnet. Durch Wiegen der Gefäße mit der Trockenmasse nach der Trocknung konnte die Trockenmasse m_T als Differenz des Gewichtes des Gefäßes mit Trockenmasse zum Leergewicht errechnet werden. Aus der so erhaltenen Trockenmasse m_T konnte noch die spezifische Trockenmasse m_T^S

$$m_T^S = \frac{m_F^{\text{def}} \cdot m_T}{m_F} \quad [m_T^S] = g \cdot g^{-1}$$

bezogen auf eine definierte Frischmasse m_F^{def} (hier $m_F^{\text{def}} = 0.5 \text{ g}$) errechnet werden. Für Werte vgl. Tab. (3.2).

Berechnung des Gehaltes an freiem Calcium in den Inkubationslösungen Der Gehalt an freiem Calcium in den Inkubationslösungen kann durch das Massenwirkungsgesetz berechnet werden. Es ermöglicht die quantitative Behandlung von Gleichgewichtsreaktionen der Form



und lautet in seiner allgemeinen Form:

$$\frac{[A] \cdot [B]}{[C] \cdot [D]} = k \quad (3.2)$$

Dabei ist k die Gleichgewichtskonstante, die für jede chemische Reaktion einen charakteristischen Wert annimmt. In diesem speziellen Fall der Gleichgewichtsreaktion zwischen Ca-EDTA und den freien Komponenten



lautet das Massenwirkungsgesetz:

$$\frac{[\text{Ca}] \cdot [\text{EDTA}]}{[\text{Ca-EDTA}]} = k \quad \text{mit} \quad k = 10^{-7.3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \quad (3.4)$$

Zur Berechnung der Konzentration $[Ca]$ des freien Calciums aus dem zugesetzten Calcium ($[Ca]_z$) gilt die Beziehung:

$$[Ca] = [Ca]_z - [Ca-EDTA] \quad (3.5)$$

Analog dazu kann die Konzentration $[EDTA]$ des freien EDTA aus dem zugesetzten EDTA ($[EDTA]_z$) errechnet werden:

$$[EDTA] = [EDTA]_z - [Ca-EDTA]$$

Durch Einsetzen dieser beiden Gleichungen in das Massenwirkungsgesetz ergibt sich dieses zu:

$$\frac{([Ca]_z - [Ca-EDTA]) \cdot ([EDTA]_z - [Ca-EDTA])}{[Ca-EDTA]} = k \quad (3.6)$$

Durch Umstellen nach $[Ca-EDTA]$ erhält man eine quadratische Gleichung

$$([Ca]_z - [Ca-EDTA]) \cdot ([EDTA]_z - [Ca-EDTA]) = k \cdot [Ca-EDTA]$$

$$[Ca-EDTA]^2 - ([Ca]_z + [EDTA]_z + k)[Ca-EDTA] + [Ca]_z[EDTA]_z = 0$$

die nach der bekannten Lösungsformel für quadratische Gleichungen für die Konzentrationen des Komplexes $[Ca-EDTA]$ gelöst werden kann:

$$[Ca-EDTA]_{1/2} = \frac{[Ca]_z + [EDTA]_z + k}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[Ca]_z + [EDTA]_z + k}{2}\right)^2 - [Ca]_z[EDTA]_z}$$

Die Berechnung der Konzentration des freien Calciums $[Ca]$ erfolgt dann über Einsetzen der erhaltenen Werte für die Konzentration des Komplexes $[Ca-EDTA]$ in Gleichung (3.5).

Extrahierte Ca-Ionen Die Stoffmenge der extrahierten Calcium-Ionen $n_{Ex}(Ca)$ errechnet sich aus dem nach dem Zentrifugieren im Sediment zurückbleibenden Volumen $V_{Sed}(EDTA)$ der EDTA-Lösung (durch Wiegen der Röhrchen leer und mit Sediment und Differenzbildung erhalten), dem Volumen $V(HCl)$ der zur Extraktion eingesetzten HCl-Lösung ($V(HCl) = 10ml$) und der nach der Extraktion im HCl-Überstand gemessenen Calcium-Konzentration $[Ca]_{Ex}$ wie folgt:

$$n_{Ex}(Ca) = \{V_{Sed}(EDTA) + V(HCl)\} \cdot [Ca]_{Ex}$$

Anteil in der Flüssigphase Der Anteil $n_{Flph}(Ca)$ der Calcium-Ionen, der aus der Waschlösung stammt, kann aus der ebenfalls gemessenen Calcium-Konzentration der Waschlösung $[Ca]_{WL}$ und dem Volumen V_{WL} der Waschlösung errechnet werden:

$$n_{Flph}(Ca) = [Ca]_{WL} \cdot V_{WL}$$

Anteil in den Zellwänden Die Stoffmenge $n_{ZW}(Ca)$ von Calcium in den Zellwänden ergibt sich aus dem Produkt der am AAS gemessenen Calcium-Konzentration $[Ca]$ im HCl-Überstand und der Trockenmasse m_T der Probe:

$$n_{ZW}(Ca) = [Ca] \cdot m_T$$

Gehalt in der Trockenmasse der Zellwand Die spezifische Calcium-Konzentration $[Ca]^S$ in der Zellwand bezogen auf ein Gramm Trockenmasse läßt sich schließlich aus dem Quotienten der Stoffmenge $n_{ZW}(Ca)$ von Calcium in den Zellwänden und der Trockenmasse m_T der Probe bestimmen:

$$[Ca]^S = \frac{n_{ZW}(Ca)}{m_T}$$

Für Werte vgl. Tab. (3.4)

Tabelle 3.4: Calciumgehalt der Zellwände von *Chenopodium album* nach verschiedenen Extraktionsschritten in Abhängigkeit von der Konzentration des Natrium-EDTA. Jeder Extraktionsschritt wurde parallel in drei Ansätzen durchgeführt.

EDTA-Konz.	Konz. der freien Ca-Ionen	Ca-Konz. in der Waschlsg. (μM)	Volumen der EDTA-Lsg. im Sediment (ml)	Frischmasse (g)	Trockenm. (mg)	Ca-Konz. im HCl-Extrakt (μM)	extrahierte Ca-Ionen (nmol)	Anteil in der Flüssigphase (nmol)	Anteil in den Zellwänden (nmol)	Gehalt in der TM der Zellw. ($\mu\text{mol/g}$)
Ansatz 1										
0.0	10^7	14.04	4.08	0.5	10.5	16.00	225.28	57.28	168.00	16.00
1.0	506	16.84	4.07	0.5	10.5	10.33	145.34	68.54	76.80	7.31
2.5	201	26.45	4.04	0.5	10.5	12.72	178.59	106.86	71.73	6.83
5.0	100	13.80	4.19	0.5	10.5	9.33	132.39	57.82	74.57	7.10
7.5	67	20.27	4.25	0.5	10.5	10.18	145.07	86.15	58.92	5.61
9.0	56	15.14	4.10	0.5	10.5	15.70	221.37	62.07	159.30	15.17
Ansatz 2										
0.0	10^7	14.04	3.84	0.5	10.5	15.25	211.06	53.91	157.15	14.97
1.0	506	16.84	4.40	0.5	10.5	10.71	154.22	74.10	80.13	7.63
2.5	201	26.45	4.23	0.5	10.5	12.04	171.33	111.88	59.45	5.66
5.0	100	13.80	4.95	0.5	10.5	9.83	146.96	68.31	78.65	7.49
7.5	67	20.27	4.30	0.5	10.5	9.78	139.85	87.16	52.69	5.02
9.0	56	15.14	4.01	0.5	10.5	9.30	130.29	60.71	69.58	6.63
Ansatz 3										
0.0	10^7	14.04	4.09	0.5	10.5	14.41	203.04	57.42	145.61	13.87
1.0	506	16.84	4.64	0.5	10.5	10.90	159.58	78.14	81.44	7.76
2.5	201	26.45	4.40	0.5	10.5	14.41	207.50	116.38	91.12	8.68
5.0	100	13.80	4.66	0.5	10.5	10.33	151.44	64.31	87.13	8.30
7.5	67	20.27	4.31	0.5	10.5	9.87	141.24	87.36	53.88	5.13
9.0	56	15.14	3.92	0.5	10.5	8.65	120.41	59.35	61.06	5.82

3.4 Ergebnisse

Entgegen der Ergebnisse aus Versuch 1 lag die Konzentration an Calcium in der Zellwand über den gesamten Bereich der EDTA-Konzentrationen (von 1 mM bis 9 mM) bei einem sehr ähnlichen Wert (ca. $8 \mu\text{M}$ pro g Trockenmasse, vgl. Abb. 3.1). Lediglich der Ansatz ganz ohne EDTA im Inkubations-Medium zeigt einen deutlich darüber liegenden Wert der Calcium-Konzentration (ca. $15 \mu\text{M}$ pro g Trockenmasse).

Außerdem fällt auf, daß die Konzentrationen von Calcium in diesem Versuch höher liegen als bei Versuch 1 (ca. $8 \mu\text{M}$ pro g Trockenmasse gegenüber $\leq 6 \mu\text{M}$ pro g Trockenmasse, vgl. Tab. (1.3)).

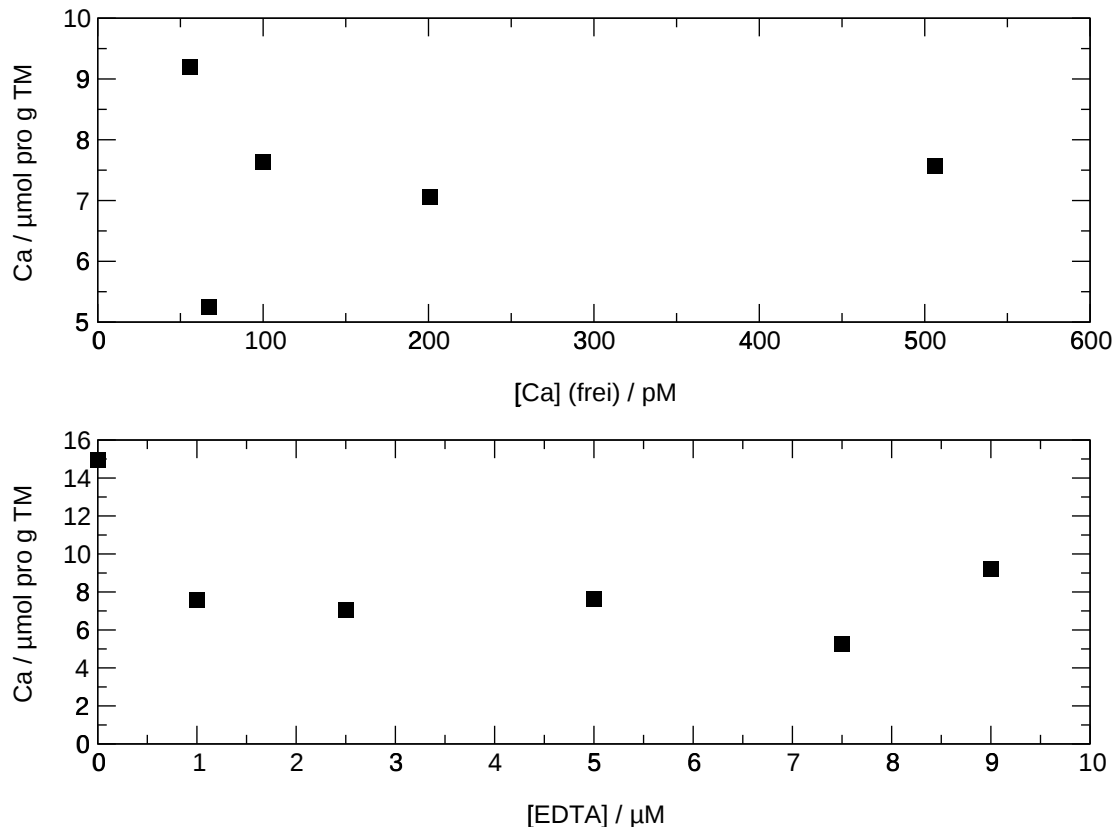


Abbildung 3.1: Calcium-Gehalt der Zellwände im Gleichgewicht mit borhaltigen EDTA-Lösungen. Die ethanolunlösliche Substanz unzerstörter Zellcluster einer Suspensionskultur von *Chenopodium album* wurde in Lösungen mit $10 \mu\text{M}$ Calciumchlorid, 1 mM Borsäure, 1 mM NaCl und unterschiedlichen Konzentrationen an Natrium-EDTA über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Menge der an den Feststoff gebundenen Calciumionen ermittelt.

3.5 Diskussion

Das eigentliche Ziel des Versuches, eine von der EDTA-Konzentration abhängige Extraktion des in der Zellwand fest gebundenen Calciums im Sinne einer Konzentrationskinetik festzustellen, gelang mit den hier gewählten Konzentrationen an EDTA nicht. Das könnte daran gelegen haben, daß die Konzentration an Calcium im System durch die Voreinstellung eines definierten Wertes ($10 \mu\text{M}$) höher lag als bei Versuch 1 (wahrscheinlich um den Faktor 10). Daher ist eine höhere Konzentration von EDTA notwendig, um das Calcium aus der Zellwand zu lösen.

Es kann aber aus den Daten geschlossen werden, daß die Bindungskonstante k für die Bindung des festgebundenen Calciums an die Zellwand ein Wert $< 56 \text{ pM}$ (entsprechend $k = 10^{-12.7}$ gegenüber $k = 10^{-7.3}$ für CaEDTA) angenommen werden muß. Das bedeutet, daß die Affinität der

Bindung des Calciums an die Zellwand mindestens um die Dimension 10^5 stärker ist als die Bindung von Calcium an EDTA. Weitergehende Aussagen und Tendenzen sind nur durch weitere Versuche möglich.

3.6 Ausblick

Alle vorliegenden Experimente haben den Charakter von Vorversuchen, die mögliche Richtungen weiterer Experimente aufzeigen. Als ein Verbesserungsvorschlag für weitere Versuche soll hier festgehalten werden, daß bei weiteren Versuchen isolierte Zellwandpräparate wie in Versuch 2 anstelle von ethanolextrahierten Zellclustern verwendet werden sollten. Die Vorteile dieser Präparationsmethode liegen auf der Hand:

1. Das Pellet wird kleiner. Das bedeutet, daß mit geringeren EDTA-Konzentrationen gearbeitet werden kann.
2. Fehler in den Meßwerten durch unerwünschte Wechselwirkungen mit den toten Zellen werden vermieden. Der Komplex aus Calcium und EDTA (CaEDTA) ist immer noch zweifach negativ geladen und kann daher vermutlich, wenn auch schwach, an Proteine binden. Das führt zu hohen Blindwerten bei den Messungen. Außerdem sind die bestimmten Calcium-Konzentrationen wahrscheinlich durch diesen Effekt bedingt um 2–3 μM zu hoch.

Dagegen hat sich die Einstellung einer definierten Calcium-Konzentration in den Lösungen bewährt, weil nur so Aussagen über die Dissoziationskonstante und damit die Affinität der Bindung des Calciums in der Zellwand gemacht werden können.

Literatur

- Carpita N, Gibeaut D** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**(1):1–30
- Cosgrove D** (1997) Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**:171–201
- Ehwald R, Fleischer A, Schneider H, O'Neill M** (2002) Stability of the borate–ester cross–link in rhamnogalacturonan II at low pH and calcium activity *in muro* and *in vivo*, in Goldbach et al. (2002)
- Fleischer A, O'Neill MA, Ehwald R** (1999) The Pore Size of Non–Graminaceous Plant Cell Walls Is Rapidly Decreased by Borate Ester Cross–Linking of the Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol* **121**:829–838
- Fleischer A, Titel C, Ehwald R** (1998) The Boron Requirement and Cell Wall Properties of Growing and Stationary Suspension–Cultured *Chenopodium album* L. Cells. *Plant Physiol* **117**:1401–1410
- Goldbach HE, Rerkasem B, Wimmer MA, Brown PH, Thellier M, Bell RW**, (eds.) (2002) Boron in Plant and Animal Nutrition, Kluwer academic publishers
- Ishii T, Matsunaga T** (1996) Isolation and characterization of a boron–rhamnogalacturonan II complex from cell walls of shugar beet pulp. *Carbohydr Res* **284**:1–9
- Ishii T, Matsunaga T, Pellerin P, O'Neill M, Darvill A, Albersheim P** (1999) The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self–assembles into a covalently cross–linked dimer. *J Biol Chem* **274**(19):13098–13104
- Kobayashi M, Matoh T, Azuma J** (1996) Two chains of rhamnogalacturonan II are cross–linked by borate diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol* **110**:1017–1020
- Kobayashi M, Nakagawa H, Asaka T, Matoh T** (1999) Borate–Rhamnogalacturonan II Bonding Reinforced by Ca^{2+} Retains Pectic Polysaccharides in Higher–Plant Cell Walls. *Plant Physiol* **119**:199–203
- Matoh T, Ishigaki K, Ohno K, Azuma J** (1993) Isolation and characterization of a boron–polysaccharide complex from radish roots. *Plant Cell Physiol* **34**:639–642
- Matoh T, Kobayashi M** (1998) Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. *J Plant Res* **111**:179–190
- O'Neill M, Albersheim P, Darvill A** (1990) The pectic polysaccharides of primary cell walls., in P Dey, J Harbourne, (eds.) *Methods in Plant Biochemistry*, vol. 2: Carbohydrates, pp. 415–441, Academic Press, London
- O'Neill M, Warrenfeltz D, Kates K, Pellerin P, Doco T, Darvill A, Albersheim P** (1996) Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is covalently cross–linked by a borate ester. *J Biol Chem* **271**:22923–22930
- Pellerin P, Doco T, Vidal S, Williams P, Brillouet J, O'Neill M** (1996) Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydr Res* **290**:183–197