

# Über das Giftsekret der Gelbbauchunke *Bombina variegata* L. (2. Mitt.)

Von

**H. Michl und H. Bachmayer**

Aus dem Analytischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 4. Juli 1963)

Acht in Unkengiften vorkommende Peptide lassen sich durch Chromatographie an Sephadex und Verteilungschromatographie trennen. Es wird ihr Verhalten bei der Hochvoltelektrophorese und Ionenaustausch-chromatographie beschrieben.

Die Abwehrsekrete der Unken besitzen eine starke hämolytische bzw. cytotoxische Wirkung. Diese findet sich zum größeren Teil in hitze-denaturierbaren Stoffen, wahrscheinlich Proteinen, und zum geringeren Teil in einer thermostabilen Oligopeptidfraktion. Daneben sind in dem Sekret 5-Hydroxytryptamin und freie Aminosäuren vorhanden<sup>1,2</sup>. Die basisch reagierenden Oligopeptide sind einander in ihrem chemischen Verhalten sehr ähnlich und neigen dazu, Aggregate zu bilden. Ansonsten sehr wirksame Trennverfahren für Peptide, wie „fingerprinting“<sup>3,4</sup>, ergaben keine Trennung. Es wurde versucht, eine Auftrennung durch Ionenaustausch-chromatographie, durch Chromatographie an Sephadex G-25 und durch Verteilungschromatographie zu erreichen.

## Experimentelles

*Material und Reagentien:* Lyophilisiertes Unkengift wurde auf die früher beschriebene Weise<sup>1</sup> hergestellt.

Puffer: pH 7,0	0,93 ml Collidin	pH 6,6	0,90 ml Collidin
	0,27 ml Eisessig		0,30 ml Eisessig

<sup>1</sup> G. Kiss und H. Michl, *Toxicon* [Oxford] **1**, 33 (1962).

<sup>2</sup> H. Michl und E. Kaiser, *Toxicon* [Oxford] **1**, im Druck.

<sup>3</sup> B. Kickhöfen und O. Westphal, *Z. Naturforsch.* **7 b**, 659 (1952).

<sup>4</sup> V. M. Ingram, *Nature* [London] **178**, 792 (1956).

pH 6,2	11 ml	Pyridin	pH 5,4	7,4 ml	Pyridin
	0,45 ml	Eisessig		2,5 ml	Eisessig
pH 5,85	10 ml	Pyridin	pH 5,1	5,6 ml	Pyridin
	1 ml	Eisessig		3,5 ml	Eisessig
pH 5,6	9,2 ml	Pyridin	pH 4,7	1,0 ml	Pyridin
	1,45 ml	Eisessig		1,0 ml	Eisessig

Die angegebenen Mengen Lösungsmittel wurden mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt und der pH-Wert elektrometrisch überprüft.

*Hochvoltektrophorese*: Es wurde die von einem von uns beschriebene Apparatur mit festen Wärmeaustauschern<sup>5</sup> unter Verwendung der angegebenen Puffer benützt.

*Ionenaustauschchromatographie*: Carboxymethylcellulose (Type MN 2100 der Fa. Macherey, Nagel & Co.) wurde durch Behandeln mit 0,1 *n* NaOH und 0,1 *n* HCl gereinigt und mit dem oben angeführten Puffer von pH 7,0 äquilibriert. 30 mg lyophilisiertes Unkengift löste man in 0,4 ml des gleichen Puffers und brachte es auf eine Säule (1,1 × 10 cm) der Carboxymethylcellulose auf. Die Peptide blieben bei diesem pH auf der Säule haften. Die Elution erfolgte stufenweise bei sinkendem pH mit den angegebenen Puffern. Der Durchbruch der Peptide erfolgt von pH 5,7 bis 5,2, bezogen auf das Elnat.

*Chromatographie an Sephadex*: 212 mg lyophilisiertes Unkengift wurden in Puffer von pH 4,7 gelöst und vom ungelöst gebliebenen Anteil (31,2 mg) abzentrifugiert. Sephadex G-25 äquilibrierte man mit dem gleichen Puffer und packte es zu einer Säule mit den Maßen 2 × 95 cm. Die Lösung wurde aufgebracht und nach dem Einsaugen mit weiterem Puffer eluiert. Die Durchfließgeschwindigkeit lag bei 11 Tropfen/Minute. Nach einem „void volume“ von 110 ml wurde mit der Fraktionierung begonnen und Fraktionen von 5 ml aufgefangen. Nach der Gefriertrocknung wurde der Rückstand gewogen, papierchromatographisch und hochvoltektrophoretisch weiterfraktioniert und seine hämolytische Wirksamkeit bestimmt.

*Papierchromatographie*: Diese erfolgte mit *n*-Propanol: Puffer (von pH 4,7) = = 2:1 auf Schleicher & Schüll 2043 b absteigend in der schon früher beschriebenen Weise<sup>1</sup>. Entwickelt wurde mit einer 0,2proz. Lösung von Bromphenolblau in mit HgCl<sub>2</sub> gesättigtem Alkohol<sup>6</sup>. Die Auswertung erfolgte mit einem Elphor Integraph-Gerät der Fa. Bender und Hobein.

*Hämolyse*: Zur Verwendung gelangten gewaschene menschliche Erythrocyten in einem isotonen Phosphatpuffer von pH 7,0. Es wurde die niedrigste Konzentration an Gift bestimmt, die noch Hämolyse bewirkt. Abgelesen wurde nach 30 Minuten und 8 Stunden.

## Ergebnisse und Diskussion

Bei der Hochvoltektrophorese wandert die Peptidfraktion des Rohgiftes ziemlich einheitlich mit einer Wanderungsgeschwindigkeit von etwa 60% der des Lysins (zwischen pH 7,0 und pH 4,6) zur Kathode. Die individuellen Wanderungsgeschwindigkeiten, die an sich eine ausreichende Trennung ermöglichen müßten, treten erst bei angereicherten

<sup>5</sup> H. Michl, Chromatogr. Reviews 1, 11 (1959).

<sup>6</sup> E. L. Durrum, J. Amer. Chem. Soc. 72, 2943 (1950).

oder reinen Peptiden auf (Tab. 1). Ein analoges Verhalten tritt auch beim Ionenaustausch auf. Die Peptide bleiben erst bei höheren pH-

Tabelle 1. Peptide im Unkengift

	$R_F$ (Papierchromatographie) <i>n</i> -Propanol--Puffer 4,7 2:1 (v/v), SS 2043 b	$R_{Lys}$ (Hochvoltektrophorese) 30 V/cm, 45 Min., 10° C pH 4,7	pH 7,0
Peptid 0	0,05	0,40	0,32
Peptid 1	0,16	0,85	0,72
Peptid 2	0,22	0,30	0,20
Peptid 3	0,32	0,52	0,42
Peptid 4	0,42	0,38	0,27
Peptid 4 a	0,50	0,50	0,40
Peptid 5	0,65	0,52	0,40
Peptid 6	0,80	0,55	0,45

Werten auf dem Austauscher haften. Bei Verwendung eines sinkenden pH-Gradienten brechen sie nahezu ungetrennt bei pH 5,7—5,2 durch. Behandeln mit gereinigtem Harnstoff ist ohne Einfluß auf diese gegenseitige Beeinflussung der Wanderungsgeschwindigkeit.

Eine typische auf Sephadex erhaltene Auftrennung zeigten Abb. 1 und Tab. 2. 40 Fraktionen sind praktisch frei von Aminosäuren und

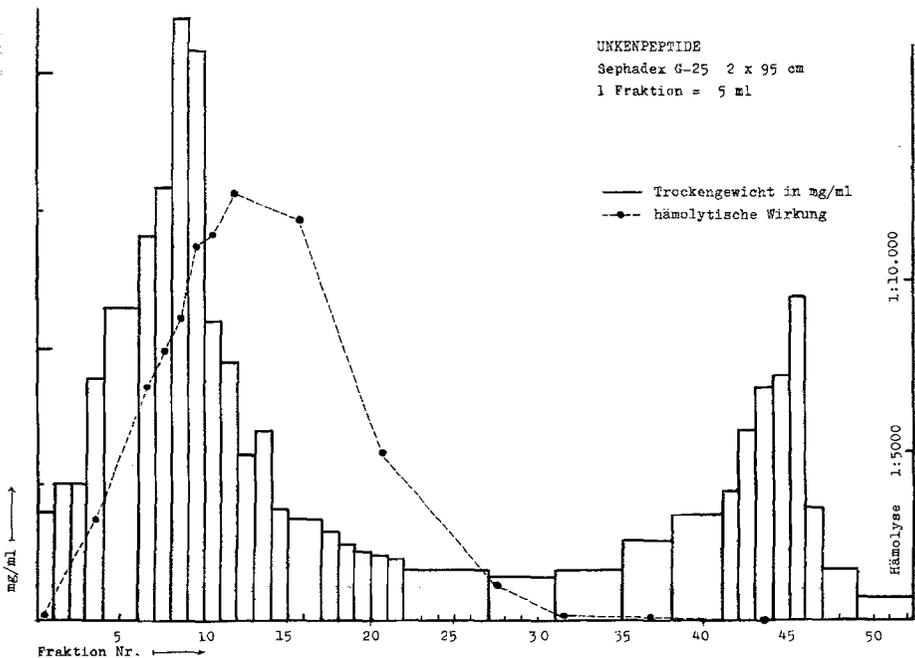


Abb. 1



Serotonin, wodurch erstmalig eine verlässliche Abtrennung dieser Verbindungen von den Peptiden möglich wurde. Tab. 2 läßt wieder deutlich die Tendenz der Peptide, Aggregate zu bilden, erkennen. Viele Peptide kommen zweimal vor, einmal zusammen mit anderen in den Fraktionen 1—10 und einmal frei in den höheren Fraktionen.

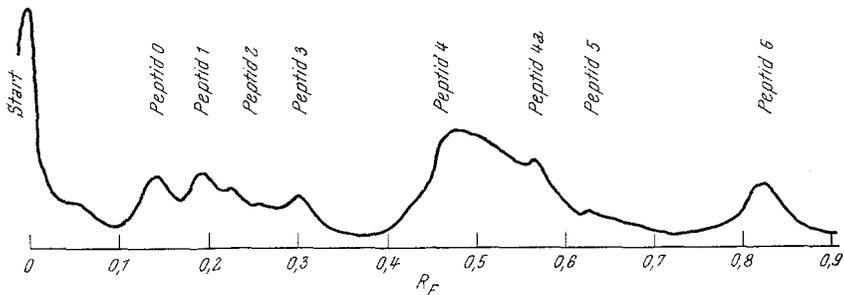


Abb. 2

Eine gute Auftrennung der Unkengifte ist durch Chromatographie mit propanolhaltigen Verteilungsmitteln möglich (Abb. 2). Allerdings enthalten die direkt aus solchen Chromatogrammen eluierbaren Peptide erhebliche Mengen von freien Aminosäuren und Serotonin. So ist Peptid 2 mit Asparaginsäure, Peptid 3 mit Glutaminsäure, Glycin, Arginin und Histidin, Peptid 4 und 4a mit Alanin und evtl. Prolin sowie Peptid 5 mit Phenylalanin, Valin und Serotonin verunreinigt. Aminosäurefreie Peptide sind jedoch aus dem über Sephadex gereinigten Material zu erhalten.

Danksagung: Es ist uns eine angenehme Pflicht, dem US-Government und den US National Institutes of Health, Bethesda, Md. (Grant RF-4), für die Unterstützung dieser Arbeit zu danken.