

# Zur Reindarstellung und Charakterisierung von Melittin, dem Haupttoxin des Bienengiftes

Kurze Mitteilung

Von

**Gertrude Kreil (geb. Kiss)**

Aus dem Institut für Chemie der Hochschule für Bodenkultur  
in Wien

(Eingegangen am 10. November 1965)

Das Gift der Honigbiene enthält neben einigen Enzymen (Hyaluronidase, Phospholipase A) als Hauptkomponente ein basisches Polypeptid, das Melittin<sup>1</sup>. Melittin ist eine pharmakologisch sehr aktive Substanz, unter anderem ist es auch in großer Verdünnung (1:10<sup>6</sup>) imstande, gewaschene Erythrocyten direkt zu hämolysieren. Bisher gelang die Gewinnung des Melittins durch Kombination von Fällungen mit Pikrinsäure und Chromatographie an Cellulose<sup>2</sup> beziehungsweise Sephadex<sup>1</sup>.

*Fischer* et al.<sup>2,3</sup> veröffentlichten eine quantitative Aminosäureanalyse des Melittins („Bienengiftfraktion I“), aus der sie im Zusammenhang mit der gleichfalls bestimmten Diffusionskonstante schlossen, daß es sich bei dieser Substanz um ein Protein mit einem Molgewicht von ca. 25 000 handeln dürfte.

Zur Fraktionierung von Bienengift und zur Reindarstellung von Melittin wurde nun folgende Methode entwickelt:

Lyophilisiertes Bienengift wurde an einer Säule (1,4 × 15 cm) mit CM-Sephadex C 50 mit logarithmischen pH-Salzgradienten aufgetrennt. Folgende Natriumphosphat-Puffer dienten als Elutionsmittel: I. Ionenstärke 0,05, pH 6,2; II. Ionenstärke 0,1, pH 8,2; III. Ionenstärke 2,0, pH 8,4. Schließlich wurde noch mit 3*n*-NaCl (pH 8,4 mit NaOH) eluiert; 5 ml-Fractionen wurden gesammelt und bei 280 m $\mu$  ausgemessen.

Als erstes wird eine nicht näher untersuchte Proteinfraction eluiert; bei pH 7,2 kommt die Phospholipase A (nachgewiesen durch Dotterkoagulations-

<sup>1</sup> *E. Habermann* und *K.-Z. Reiz*, *Biochem. Z.* **341**, 451 (1965).

<sup>2</sup> *F. G. Fischer* und *H. Dörfel*, *Biochem. Z.* **342**, 465 (1953).

<sup>3</sup> *F. G. Fischer* und *W. P. Neumann*, *Biochem. Z.* **335**, 51 (1961).

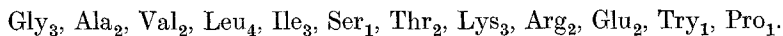
test<sup>4</sup>) als scharfe Bande aus der Säule und bei einem pH von 8,2 das Melittin (nachgewiesen durch seine direkt hämolysierende Wirkung<sup>4</sup>). Ganz zuletzt werden noch einige kleine Fraktionen eluiert, bei denen es sich vermutlich um die von *Habermann* et al. beschriebenen basischen Peptide (Apamin, *FOa*, *FOp*) handelt<sup>1</sup>.

Zur Entsalzung wird das Melittin mit Pikrinsäure gefällt, das Pikrat mit Aceton gewaschen und mit acet. HCl gespalten<sup>5</sup>.

Das so erhaltene Produkt ist salzfrei, es wandert bei der Niedervolt-elektrophorese als einheitliche Bande (bei Hochvoltelektrophorese tritt Verschmierung ein<sup>1</sup>) und bei Papier-Chromatographie in Propanol—Pyridinacetatpuffer pH 4,7 (2:1) als einheitlicher, mit Ninhydrin nur schwach, mit Bromphenolblau gut anfärbbarer Fleck.

Endgruppenbestimmung mit Fluordinitrobenzol<sup>6, 7</sup> und mit 1-Dimethylaminonaphthyl-5-sulfonylchlorid (DNS-Cl)<sup>8</sup> ergibt als einzige N-terminale Gruppe Glycin. Obwohl mit letzterer Methode bis zu  $10^{-5}$   $\mu\text{M}$  von Aminosäuren mit freier Aminogruppe nachgewiesen werden können, wurde neben Glycin keine andere DNS-Aminosäure gefunden.

Einen weiteren Beweis für die Reinheit des Melittins erbringt die quantitative Aminosäureanalyse. Berechnet auf 10 000 g Hydrolysat wurden gefunden: Gly 6,56; Ala 4,56; Val 3,53; Leu 8,98; Ile 6,35; Ser 1,67; Thr 4,08; Lys 5,96; Arg 4,52; Glu 4,51; Try 0,8 (nicht quantitativ); Pro 2,43 Mol. Aus dieser Analyse läßt sich folgende Minimalbruttoformel für das Melittin berechnen:



In Übereinstimmung mit der von *Fischer* et al.<sup>21, 3</sup> angegebenen quantitativen Zusammensetzung fehlen einige proteinogene Aminosäuren vollständige (Asparaginsäure, Histidin, Phenylalanin, Tyrosin, Methionin und Cystein).

Wie vorläufige Versuche gezeigt haben, wird Melittin von Trypsin in sieben Bruchstücke gespalten, von denen zwei mehr als eine basische Aminosäure enthalten. Nach obiger Summenformel und der bekannten Spezifität von Trypsin wäre — quantitative Spaltung jeder Bindung vorausgesetzt — ein Minimum von sechs Peptiden zu erwarten.

Dieser Befund spricht eindeutig dafür, daß die oben angegebene Minimalzusammensetzung mit der tatsächlichen Bruttoformel des Melittins identisch ist (entsprechend einem Molgewicht von 2850). Bei einem Molgewicht von 25 000, was etwa dem Zehnfachen der angegebenen

<sup>4</sup> *W. Grassmann* und *H. Hannig*, *Z. physiol. Chem.* **296**, 30 (1954).

<sup>5</sup> *C. Tetsch* und *K. Wolff*, *Biochem. Z.* **288**, 126 (1936).

<sup>6</sup> *F. Sanger*, *Biochemic. J.* **45**, 463 (1949).

<sup>7</sup> *S. Blackburn* und *A. Lowther*, *Biochemic. J.* **48**, 126 (1951).

<sup>8</sup> *W. R. Gray* und *B. S. Hartley*, *Biochemic. J.* **89**, 379 (1963).

Zusammensetzung entsprechen würde, müßte selbstverständlich eine viel größere Anzahl von tryptischen Abbauprodukten entstehen. Auch das Fehlen so ubiquitärer Aminosäuren wie Asparaginsäure, Histidin, Phenylalanin, Tyrosin usw. in einem so hochmolekularen Protein erscheint nach allen bisherigen Beobachtungen sehr unwahrscheinlich.

Für die Peptidnatur des Melittins spricht neben seinem chromatographischen Verhalten auch seine Hitzebeständigkeit. Zwanzig Minuten langes Erhitzen im siedenden Wasserbad verändert weder seine hämolytische Wirksamkeit noch sein chromatographisches oder elektrophoretisches Verhalten. Melittin diffundiert außerdem rasch durch Dialysiermembranen, welche für Cytochrom-c (Molgewicht 12 400) undurchlässig sind.

Nach den erwähnten Befunden ist Melittin ein aus 26 Aminosäureresten aufgebautes Peptid mit N-terminalem Glycin. Die beschriebene Reinigungsmethode erlaubt auf Grund der hohen Kapazität von CM-Sephadex C 50 (eine 5 ml-Säule kann mindestens 1 g Protein adsorbieren) die Gewinnung großer Mengen dieses Peptids in wenigen Arbeitsschritten. Die Ermittlung der Aminosäuresequenz wurde in Angriff genommen.

Meinen Dank möchte ich aussprechen Herrn Dr. *M. Weiser* (Mediz.-chem. Institut der Tierärztlichen Hochschule Wien) für die Durchführung der quantitativen Aminosäureanalyse und Herrn Prof. Dr. *H. Michl* für die Förderung dieses Projektes mit den ihm vom Österreichischen Forschungsrat zur Verfügung gestellten Mitteln.