

Isolierung und Strukturaufklärung eines hämolytisch wirkenden Polypeptides aus dem Abwehrsekret europäischer Unken

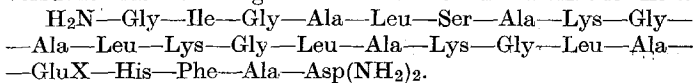
Von

A. Csordás und H. Michl

Aus dem Institut für Chemie der Hochschule für Bodenkultur Wien

(Eingegangen am 20. August 1969)

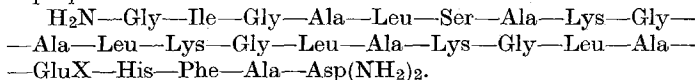
Ein aus 24 Aminosäuren bestehendes Polypeptid wurde aus dem Abwehrsekret europäischer Unken isoliert. Abbauversuche machen folgende Primärstruktur wahrscheinlich:



Das Polypeptid („Bombinin“) wird durch die proteolytischen Enzyme des Unkengiftes rasch abgebaut. Es wirkt hämolytisch und zeigt gewisse strukturelle Analogien zu Melittin.

Isolation and Structure of an Hemolytic Polypeptide from the Defensive Secretion of European Bombina species.

A tetracosapeptide has been isolated from the defensive secretion of European unks. The following primary structure is proposed:



The polypeptide (bombinin) is quickly hydrolyzed by the proteolytic enzymes of the “unk” toxin. Bombinin shows hemolytic activity. Its structure resembles somewhat that of melittin.

Das Abwehrsekret der europäischen Unken (*Bombina* Species) besteht aus einem Gemisch von Proteinen, Peptiden, Aminosäuren und 5-Hydroxytryptamin¹. Der größte Teil der biologischen Aktivitäten findet sich in der Proteinfraction, z. B. proteolytische Enzyme^{2, 3}, die Amylase⁴ und direkt wirkende Hämolytine^{1, 5, 6}. Aber auch unter den

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

² H. Michl und H. Molzer, *Toxicon* [Oxford] **2**, 281 (1965).

³ H. Molzer und H. Michl, *Toxicon* [Oxford] **5**, 105 (1967).

⁴ H. Michl und A. Pastuszyn, *Mh. Chem.* **95**, 978 (1964).

⁵ F. Pröscher, *Beiträge zur chem. Physiol. Pathol.* [Braunschweig] **1**, 575 (1902).

⁶ O. Gessner, *Arch. Exper. Pathol. Pharmakol.* **118**, 325 (1926).

Peptiden sind solche mit bakteriostatischer und hämolytischer Wirksamkeit anzutreffen^{1, 7, 8}. Die hämolytische Aktivität nimmt, wie *Pröschner* bereits 1902 zeigte⁵, in wäßrigen Lösungen von Unkengift rasch ab. Dafür sind, wie kürzlich erwähnt wurde⁸, in erster Linie die proteolytischen Enzyme des Giftes verantwortlich. Durch eine möglichst schnelle und schonende Aufarbeitung sollte nun versucht werden, wirksame Peptide möglichst vor ihrem Abbau zu kleineren Bruchstücken zu isolieren und chemisch zu charakterisieren.

Material und Methoden

Unkengift

Das Sekret wurde nach dem schon beschriebenen Prinzip gewonnen¹, das „Melken“ jedoch unter Verzicht auf eine optimale Ausbeute auf wenige Minuten verkürzt. Die so erhaltene Lösung wurde sofort eingefroren und lyophilisiert. Aufgetaute Proben wurden ausgeschieden.

Fraktionierung mit Aceton

Etwa 400 mg lyophilisiertes Unkengift* wurden bei 0° in 30 ml Pyridin-acetatpuffer pH 4,7 (1 ml Pyridin und 1 ml Eisessig auf 100 ml aufgefüllt) gelöst und von unlöslichen Rückständen abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit der dreifachen Menge (*v/v*) auf —20° vorgekühlten Aceton gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wird der Überstand mit dem gleichen Volumen kaltem Aceton versetzt und diesmal der Niederschlag gewonnen. in dest. Wasser gelöst und lyophilisiert. Die so gewonnene Fraktion, etwa 5% des Vollgiftes, enthält Teile der Peptidfraktion, vor allem Peptid 4, 4a und 5, sowie geringe Mengen freier Aminosäuren. Das hier beschriebene Produkt zeigte jedoch bei der Elektrophorese bei pH 4,7 eine einzige bromphenolblau-positive Bande, deren R_{Lys} -Wert mit 0,55 zwischen dem von Peptid 4 (R_{Lys} 0,46) und 4a (R_{Lys} 0,57) lag. Man kann das neue Peptid schon ohne Anfärbung während der Wanderung beobachten, da es ähnlich dem Melittin und anderen oberflächenaktiven Stoffen den Feuchtigkeitsgehalt des Papiers ändert. Es war hämolytisch aktiv und wurde analog dem Melittin mit „Bombinin“ bezeichnet.

Chromatographie an Sephadex G-25

Zur Gewinnung des Bombinins wurden 20 mg lyophilisierte Acetonfällung in 3 ml dest. Wasser gelöst und bei z. T. auf einer mit Sephadex G-25 gefüllten Säule (1,5 × 70 cm) chromatographiert. Das mit „Blue Dextran“ bestimmte Leervolumen dieser Säule lag bei 30 ml. 3 ml-Fractionen wurden aufgefangen. Gleich nach dem Ausfluß des Leervolumens brechen die Peptide durch die Säule und erreichen etwa bei dem 1,5fachen Leervolumen ein Maximum, während die Aminosäuren erst nach Durchfluß des doppelten

* Aus 20—30 „Melk“-Operationen.

⁷ *H. Bachmayer, H. Michl* und *B. Roos*, in „Animal Toxins“ (Herausgeber: *F. E. Russell* und *P. R. Saunders*), Pergamon Press 1967, Oxford.

⁸ *A. Csordas* und *H. Michl*, *Toxicon* [Oxford] 7, 103 (1969).

Leervolumens die Säule verlassen (vgl.⁹). Die Ausbeute an bombininhaltigem Material lag bei 12 mg.

Dünnschichtchromatographie an Cellulosepulver

Die weitere Reinigung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie an Cellulosepulver MN 30 (Macherey-Nagel). Als Laufmittel diente *n*-Propanol:Pyridinacetatpuffer pH 4,7 im Verhältnis 2:1 (*v/v*). Der R_F -Wert des Bombinins lag hier mit 0,78 höher als auf Whatman 3MM-Papier (R_F 0,62); Ausb. 6—8 mg.

Hochvoltektrophoresen

Als letzter Schritt wurden schließlich elektrophoretische Trennungen zuerst bei pH 4,7, dann bei pH 2,0 (2,5 ml 80proz. Ameisensäure und 8,7 ml Eisessig ad 100 ml) durchgeführt. Als Träger wurde Whatman 3MM-Papier verwendet. Die Ausb. an Bombinin lagen nach der ersten Elektrophorese bei 3—4 mg, nach der zweiten bei 2 mg.

Quantitative Bestimmung der Aminosäuren

Die Bestimmung der Bruttoformel des Bombinins und seiner Spaltprodukte erfolgte nach 24stdg. Hydrolyse in 6*n*-HCl nach einem modifizierten *Stein—Moore*-Verfahren¹⁰. Die Analysen wurden mit einem Beckman-Unichrom-Aminosäureanalysator durchgeführt. Als Ionenaustauscher dienten sphärische Beckman Custom Research Resins, Type PA-35 und PA-28.

Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren

Diese erfolgte in den meisten Fällen nach *Gray* und *Hartley*¹¹. Zur Identifizierung der DNS-Aminosäuren wurde Hochvoltektrophorese¹² oder Dünnschichtchromatographie¹³ verwendet. Der *Edman*-Abbau erfolgte nach einer Differenzmethode¹⁴.

Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren

Hier wurde die Hydrazinolyse nach *Akabori*¹⁵ angewendet.

Enzymatische Spaltungen

Folgende Enzyme wurden verwendet: Chymotrypsin (Fluka A 52342), Trypsin (Fluka A 58123) und Pronase (Calbiochem *Streptomyces griseus* Protease 53702). Der Abbau erfolgte in allen 3 Fällen in 0,01*M*-Ammoniacetatpuffer von pH 8,0. Es wurden 5proz. Lösungen des Enzyms verwendet. Mit Trypsin wurde 8 Stdn., mit Chymotrypsin 25 Min. bzw. 6 Stdn., mit Pronase 2 Stdn. inkubiert.

⁹ H. Michl und H. Bachmayer, Mh. Chem. **94**, 814 (1963).

¹⁰ J. V. Benson, Jr., und J. A. Patterson, Analyt. Chem. **37**, 1108 (1965).

¹¹ W. R. Gray und B. S. Hartley, Biochem. J. **89**, 59 P (1963).

¹² W. R. Gray und B. S. Hartley, Biochem. J. **89**, 379 (1963).

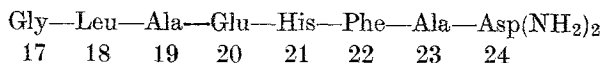
¹³ N. Seiler und J. Wiechmann, Experientia [Basel] **20**, 559 (1964).

¹⁴ E. Margoliash, J. Biol. Chem. **237**, 2161 (1962).

¹⁵ S. Akabori, K. Ohno und K. Narita, Bull. Chem. Soc. Japan **25**, 214 (1952).

Ergebnisse

Die Bruttoformel des Bombinins entsprach der eines Tetracosapeptides Ala₆, Asp, Glu, Gly₅, His, Ile, Leu₄, Lys₃, Phe und Ser, wobei die Werte für Gly und Ser etwas zu hoch waren. Gly war die N-terminale Endgruppe; C-terminale Endgruppen wurden nicht gefunden. In Tab. 1 sind die mittels Trypsin und Chymotrypsin erhaltenen Abbaupeptide angegeben. Sie lassen sich zu der in Tab. 2 angegebenen Primärstruktur zusammenfassen. Zur Ableitung derselben kann man von den lysinfreien tryptischen Bruchstücken T_2 und T_3 ausgehen. T_1 hat um ein Ala, Asp weniger als T_2 und ist aus diesem wahrscheinlich durch eine geringe chymotryptische Aktivität des verwendeten Trypsins entstanden. Tatsächlich findet man unter den chymotryptischen Bruchstücken ein stark basisches Dipeptid Ala—AspX₂ (CB_7 , CB_{10}), wie es schon in früheren Arbeiten^{1, 16} als C-terminales Ende des Peptides 2 erhalten und als Ala—Asp(NH₂)₂ identifiziert wurde. In Analogie zum Peptid 2 läßt sich auch die weitere Sequenz leicht erkennen. His und Phe kommen nur einmal im Gesamtmolekül vor, es muß daher das chymotryptische Bruchstück CB_1 in T_2 und T_3 enthalten sein. Dieses Tetrapeptid wird durch kurzzeitiges Einwirken von Pronase in zwei Dipeptide gespalten. Eines wandert bei pH 4,7 anodisch ($R_{Asp} = 0,44$) und enthält Ala und Glu. Das zweite zeigt kathodische Wanderung ($R_{Lys} = 0,60$) und besteht aus His und Phe. Aus der Zusammensetzung dieser Dipeptide, den Endgruppenbestimmungen und der Identität mit einem früher beschriebenen Tetrapeptid ist die Sequenz festgelegt. Damit kann auch die Gesamtstruktur von T_2 unter Berücksichtigung des N-terminalen Gly angegeben werden:



Auch das Abbaupeptid CB_6 muß in T_2 enthalten sein. Es hat die gleiche Sequenz wie das früher¹ beschriebene Peptid 2, jedoch eine deutlich erhöhte elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von $R_{Lys} = 0,74$ gegen 0,40 von synthetischen Peptid 2 mit intakter Asp(NH₂)₂-Gruppe und freier Carboxylgruppe der Glutaminsäure. Das spricht dafür, daß diese Carboxylgruppe in CB_6 blockiert war. Die weitere Reihenfolge kann nun aus den Peptiden CB_3 und CB_8 , die beide His und Phe enthalten, abgeleitet werden. CB_3 unterscheidet sich von T_3 durch je ein zusätzliches Ala und Lys, die auf Grund der Endgruppenbestimmung die Positionen 15 und 16 innehaben müssen. Einen zusätzlichen Anhaltspunkt für die Sequenz von 15 bis 18 liefert das Tetrapeptid CB_4 .

¹⁶ H. Nesvadba, H. Bachmayer und H. Michl, Mh. Chem. **96**, 1125 (1965).

Tabelle I. Abbaupeptide des Bombinins

Bezeichnung	HV-Elektrophorese, pH 4,7 R_{Lys} -Werte	Quant. Aminosäure-zusammensetzung	Abbauenzym	N-terminale Aminosäure	C-terminale Aminosäure
T_1	0,29	Ala ₂ , Gly ₂ , Ile, Leu, Lys, Ser *	Trypsin, 6 ^h	Gly	nicht bestimmt
T_2	0,41	Ala ₂ , Asp, Glu, Gly, His, Leu, Phe	Trypsin, 6 ^h	Gly	nicht bestimmt
T_3	0,49	Ala, Glu, Gly, His, Leu, Phe	Trypsin, 6 ^h	Gly	Phe
T_4	0,64	Ala, Gly, Leu, Lys	Trypsin, 6 ^h	Gly	nicht bestimmt
CN_1	Start	Ala, Gly ₂ , Ile, Leu	Chymotrypsin, 8 ^h	Gly	Leu
CN_2	Start	Gly, Leu	Chymotrypsin, 8 ^h	Gly	nicht bestimmt
CB_1	0,13	Ala, Glu, His, Phe	Chymotrypsin, 8 ^h	Ala	Phe
CB_2	0,37	Ala ₂ , Gly, Leu, Lys, Ser	Chymotrypsin, 8 ^h	Ser	nicht bestimmt
CB_3	0,41	Ala ₂ , Gly, Glu, His, Leu, Lys, Phe	Chymotrypsin, 8 ^h	Ala	nicht bestimmt
CB_4	0,64	Ala, Gly, Leu, Lys	Chymotrypsin, 8 ^h	Ala	Leu
CB_5	0,69	Gly, Leu, Lys	Chymotrypsin, 8 ^h	Lys	Leu
CB_6	0,74	Ala ₂ , Asp, Glu, His, Phe	Chymotrypsin, 8 ^h	Ala	nicht bestimmt
CB_7	0,88	Ala, Asp	Chymotrypsin, 8 ^h	Ala	nicht bestimmt
CB_8	0,25	Ala ₂ , Gly ₂ , Glu, His, Leu ₂ , Lys ₂ , Phe	Chymotrypsin, 15 ^m	Lys	nicht bestimmt
CB_9	0,37 = CB_2	Ala ₂ , Gly, Leu, Lys, Ser	Chymotrypsin, 15 ^m	Ser	Leu
CB_{10}	0,88 = CB_7	Ala, Asp	Chymotrypsin, 15 ^m	Ala	nicht bestimmt

* Die Aminosäuren wurden in üblicher Weise mit ihren ersten drei Buchstaben abgekürzt.

Tabello 2

CB_8																							
CN_1						CN_2						CN_3						CB_6					
CB_2						CB_5						CB_4						CB_1					
CB_9						CB_8						CB_7						CB_{10}					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
T_1						T_4						T_4						T_2					
T_1						T_3						T_3						T_2					
Peptid 7																							
Peptid 2																							

H_2N -Gly-Ile-Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Lys-Gly-Ala-Lys-Leu-Lys-Gly-Leu-Ala-Lys-Gly-Leu-Ala-GluX-His-Phe-Ala-Asp(NH₂)₂

Abbaupeptid CB_8 hat um drei Aminosäuren, und zwar um je ein Lys, Gly und Leu, mehr als CB_3 , muß also bis zur Position 12 vorstoßen. Bei einem N-terminalen Lys bleibt nur die Reihenfolge von Gly und Leu offen. Eine Placierung von Leu auf 13 und Gly auf 14 würde eine sehr befriedigende Erklärung für die Entstehung des Nonapeptides 4 aß⁸ in Unkengift geben, dessen Sequenz dann identisch mit der Reihenfolge der Aminosäuren von 14 bis 22 wäre. Mehr Gewicht wurde aber schließlich dem Spaltstück CB_5 gegeben (12—14), das wegen der Spezifität des Chymotrypsins kaum aus der sonst gleichen Sequenz 16—18 entstanden sein kann. Auch das Bruchstück CB_4 wäre andernfalls schwer zu erklären. Weitere Anhaltspunkte für das Mittelstück des Bombinins liefert auch das tryptische Bruchstück T_4 . Die quantitative Analyse der tryptischen Bruchstücke ergänzt sich zur Gesamtzahl der Aminosäuren nur dann, wenn man T_4 eine dimere Formel (Ala, Gly, Leu, Lys)₂ zuschreibt, wobei man eine schwer spaltbare Sequenz Lys—Lys am C-terminalen Ende annehmen müßte. Für eine solche Anordnung findet man aber unter den chymotryptischen Bruchstücken keinerlei Anhaltspunkte. Es bleibt also nur die Möglichkeit, daß die Sequenz Gly (Ala, Leu) Lys zweimal vorkommt. Diese beiden Peptide lassen sich wegen der gleichen terminalen Aminosäuren und Bruttoformeln nicht trennen. Eine dieser Sequenzen fand sich in CB_8 von 13 bis 16. Die zweite müßte die Positionen 9—11 einnehmen, da das dritte Lys in T_1 steckt. Das langsamste tryptische Bruchstück T_1 enthält ebenso wie CN_1 den einzigen Ile-Rest des Bombinins, und zwar, wie ein stufenweiser *Edman*-Abbau ergab, an vorletzter Stelle des N-terminalen Endes. T_1 ist ferner ein um die drei Aminosäuren Ser, Ala, Lys verlängertes CN_1 . Ser kommt ebenfalls nur einmal im Bombinin vor und ist die N-terminale Aminosäure der chymotryptischen Abbauprodukte CB_2 und CB_9 , deren Reihenfolge durch die tryptischen Abbauprodukte T_1 und T_4 festgelegt ist. Die Sequenz von CN_1 konnte durch Partialhydrolyse in konz. Salzsäure (48 Stdn. bei Zimmertemp.) festgelegt werden. In der Reihenfolge ihrer Wanderungsgeschwindigkeit bei pH 2,0 fand man die Bruchstücke: Gly (Ala, Gly, Ileu), Leu (Gly, Ile, Ala, Leu), Ala-Leu und Gly (Ile, Gly). Damit und mit dem erwähnten *Edman*-Abbau konnte die restliche Sequenz festgelegt werden. Das im Unkenvollgift anzutreffende Peptid 7 entspricht wahrscheinlich dem Bruchstück CN_1 ¹⁷.

Diskussion

Zwischen Bombinin und dem im Bienengift vorkommenden Melittin besteht eine gewisse Ähnlichkeit. Die Sequenz der ersten vier Aminosäuren stimmt in beiden Polypeptiden überein. Bombinin besteht aus

¹⁷ H. Molzer, unveröffentlichte Mitteilung.

24 Aminosäuren, von denen 10 verschieden sind, Melittin aus 26, davon 12 verschiedenen. Bombinin besitzt 4 basische, 2 saure und 1 Hydroxyaminosäure, in Melittin sind 5 Aminosäuren basisch, 2 sauer und 4 enthalten Hydroxygruppen. In beiden Peptiden sind alle Carboxylgruppen verschlossen¹⁸.

Die basischen Aminosäuren sind im Melittin sehr unsymmetrisch — auf 7, 21—24 — verteilt. Im Bombinin dagegen sind sie ziemlich gleichmäßig über das ganze Molekül verstreut, und zwar in 8, 12, 16 und 21. Besonders auffällig dabei ist die Monotonie, mit der sich die Sequenz Lys (Gly, Ala, Leu) wiederholt, eine Regelmäßigkeit, die fast nur in Faserproteinen auftritt.

Es ist uns eine angenehme Pflicht, dem Österreichischen Forschungsrat für die Unterstützung dieser Arbeit und dem Kuratorium der Österreichischen Nationalbank für die Spende eines Aminosäureanalysators zu danken.

¹⁸ *J. Jentsch* und *E. Habermann*, Proc. 8th European Peptide Symposium, Noordwijk, Sept. 1966, Elsevier, Amsterdam 1967.