

Abtrennung des anaphylatoxinbildenden Prinzips aus Cobragift von anderen Giftkomponenten

Cobragift, das mit Meerschweinchen Serum inkubiert wird, entwickelt ein stark wirksames Anaphylatoxin. Während die ersten Beobachter dieser Reaktion, FRIEDBERGER, MITA und KUMAGAI¹, eine Abspaltung des Anaphylatoxins aus dem Cobragift durch das Komplement des Meerschweinchen Serums annahmen; ist das Substrat heute in das Serum zu verlegen², während das Cobragift die Rolle des anaphylatoxinbildenden Agens spielt. Wie kürzlich gezeigt wurde³, kann Anaphylatoxin mit Cobragift auch in Rattenplasma erzeugt werden, das ein besonders gutes Substrat darstellt⁴. Um das anaphylatoxinbildende Prinzip des Cobragiftes näher zu charakterisieren, versuchten wir, es von anderen Giftbestandteilen abzutrennen. Zum Nachweis der anaphylatoxinbildenden Aktivität wurden erhaltene Giftfraktionen mit Rattenplasma 15 min bei 37° inkubiert und am isolierten Meerschweinchenileum auf Anaphylatoxinwirkung⁵ geprüft.

20–50 mg Trockengift von *Naja naja* wurden mit H₂O durch Säulen von Sephadex G 100 filtriert und der Durchlauf fraktioniert aufgefangen. Das anaphylatoxinbildende Prinzip fand sich bereits in den ersten Fraktionen, zusammen mit proteolytischer Aktivität (gemessen mit Casein als Substrat). Anschließend folgte Phospholipase A (gemessen nach⁶) und in einigem Abstand die direkt hämolysierenden und darmkontrahierenden Giftfraktionen (Figur 1).

Durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A 25 konnten bei Verwendung eines Salzgradienten die proteolytische und anaphylatoxinbildende Aktivität vollständig getrennt werden (Figur 2). Danach ist das anaphylatoxinbildende Prinzip mit keinem der übrigen untersuchten Fermente und Toxine identisch.

In präparativen Ansätzen wurden einmal 50 mg und einmal 90 mg Gift zunächst an DEAE-Sephadex chromatographiert, die erhaltenen anaphylatoxinbildenden Fraktionen gesammelt und durch Ultrafiltration konzentriert. Das Konzentrat wurde danach mit Wasser durch Sephadex G 100 filtriert und dadurch weiter gereinigt und gleichzeitig entsalzt. Das von dem 90 mg-Ansatz erhaltene Produkt wog nach Gefriertrocknung 3,4 mg (4% Gewichtsabgabe). Soweit sich das abschätzen lässt, war im Anaphylatoxinbildungsvermögen kein Verlust eingetreten. Noch in einer Verdünnung von 5×10^{-7} bewirkt das gereinigte Prinzip in 15 min bei 37° eine starke Anaphylatoxinbildung. Vermutlich wird das Molekül in seiner Grösse durch die DEAE-Sephadex-Chromatographie etwas verändert, da es danach von Sephadex G 100 stärker zurückgehalten wird als ohne diese Reinigung.

Das anaphylatoxinbildende Prinzip ist ein Protein: die gereinigte Fraktion hatte 13% N und zeigte nach Totalhydrolyse mindestens 7 verschiedene Aminosäuren. Es ist in verdünnter Salzlösung besser löslich als in Wasser, seine Wirkung wird durch Kochen zerstört. Bei pH 4,0 und Zimmertemperatur der Lösung bleibt die Substanz monatelang wirksam, bei pH 2,9 wird sie in Sekunden inaktiviert.

Es handelt sich vermutlich nicht um einen Aktivator, der wie andere Aktivatoren (Kontaktstoffe, z. B. Immunpräzipitate, Agar, Dextran, Sephadex oder Lipopolysaccharid u. a.) lediglich ein im Rattenplasma vorhandenes vollständiges anaphylatoxinbildendes Prinzip zur Reaktion bringt. Aus folgenden Gründen ist anzunehmen, dass ein Ferment vorliegt: (1) Es bildet noch Anaphylatoxin in einer Fraktion von Rattenplasma (durch Gelfiltration er-

halten), die dazu mit den oben erwähnten Aktivatoren nicht angeregt werden kann, die also nur Substrat, aber nicht das ganze plasmatische anaphylatoxinbildende System enthält. (2) Die Anaphylatoxinbildung durch Cobragift geht auch bei einer Konzentration von 0,66 M Natriumchlorid vor sich, im Gegensatz zu der durch Kontaktstoffe ausgelöst. (3) EDTA hemmt die Anaphylatoxinbildung durch Cobragift bzw. durch dessen aktive Fraktion nur partiell, die durch andere Aktivatoren bewirkte dagegen vollständig.

Das Ferment wirkt spezifisch, es greift in Konzentrationen, die 100fach höher liegen als zur Anaphylatoxinbildung nötig, weder Casein noch Benzoylarginin-nitroanilid, Tosylargininmethylester, Lysinmethylester oder N-Acetyl-tyrosinäthylester an. Bei der Anaphylatoxinbildung durch Cobragift handelt es sich um eine Abspaltung aus einer Vorstufe (Anaphylatoxinogen): Wenn natives Rattenplasma mit Anaphylatoxin gemischt und durch Sephadex G 100 filtriert wird, erscheint das vorgebildete Anaphylatoxin wesentlich später im Durchlauf als die noch inaktive Plasmafraktion, aus der mit Cobragift Anaphylatoxin gebildet werden kann. Die Vorstufe ist also ein grösseres Molekül als das Produkt, Anaphylatoxin.

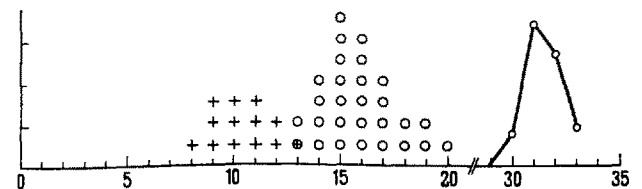


Fig. 1. Gelfiltration von 20 mg *Naja-naja*-Gift in Wasser an Sephadex G 100 (Säulenmasse: 1,5 cm Ø; 40 cm hoch). Fraktionen zu je 2 ml, angegeben sind die laufenden Rohrnummern. + = anaphylatoxinbildendes Prinzip. In diesem Bereich lag auch die proteolytische Wirkung. O = Phospholipase A. O-O = direkte Hämolysen, die Ordinate gibt die Zeit bis zur kompletten Hämolysen von Meerschweinchenerythrocyten in reziproker Zeiteinheit (Grösse willkürlich gewählt) an. Die direkt hämolysierenden Fraktionen hatten auch direkte darmkontrahierende Wirkung.

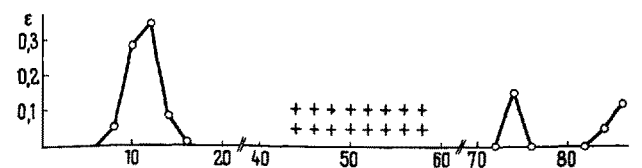


Fig. 2. Ionenaustauschchromatographie von 20 mg *Naja-naja*-Gift an DEAE-Sephadex A 25 (1,8 cm Ø; 30 cm hoch), äquilibriert mit 0,02 mol Trispuffer pH 7,4. Entwicklung mit 20 ml der gleichen Lösung, danach mit einem linearen Gradienten, hergestellt aus 50 ml der gleichen Lösung und 50 ml 1 mol NaCl in 0,02 mol Trispuffer pH 7,4. + = anaphylatoxinbildendes Prinzip. O-O = proteolytische Aktivität (Caseinspaltung).

¹ E. FRIEDBERGER, S. MITA und T. KUMAGAI, Z. Immunitätsforschung 17, 506 (1913).

² F. HAHN und A. LANGE, Dtsch. med. Wschr. 81, 1269 (1956).

³ W. VOGT, Arch. exp. Path. Pharmacol. 246, 31 (1963).

⁴ F. G. NOVY und P. H. DE KRUIF, J. Inf. Disease. 20, 776 (1917).

⁵ A. M. ROTHSCHILD und M. ROCHA E SILVA, Brit. J. exp. Path. 35, 507 (1954).

⁶ W. VOGT und H. STEGEMANN, in Vorbereitung.

Wir nehmen an, dass das durch Cobragift gebildete Anaphylatoxin das gleiche ist wie das durch Dextran u. a. Aktivatoren freigelegte. Diese Annahme gründet sich auf folgende Befunde: Beide Anaphylatoxine zeigen am isolierten Meerschweinchendarm den gleichen Wirkungsablauf, Tachyphylaxie mit Erholung⁷ und gekreuzte Tachyphylaxie. Rinder-, Pferde- und Menschenplasma, die mit Dextran u. a. kein Anaphylatoxin bilden, tun dies auch nicht mit Cobragift. Eine Ausnahme bildet Schweineplasma. Es gewinnt nach Inkubation mit Cobravollgift oder dem gereinigten Cobraferment eine starke Anaphylatoxinaktivität, die die gleichen Eigenschaften wie Ratten-Anaphylatoxin zeigt. Offenbar enthält Schweineplasma Substrat für Anaphylatoxin, aber kein vollständiges anaphylatoxinbildendes System.

Akzeptiert man die noch nicht bewiesene, aber wahrscheinliche Vermutung, dass die verschiedenen Methoden der Anaphylatoxinbildung zum gleichen Produkt führen, so würde dies bedeuten, dass auch die klassische Herstellung von Anaphylatoxin durch Kontaktsubstanzen ein fermentativer Spaltprozess ist, der durch die angewandten Substanzen aktiviert wird⁸.

⁷ K. D. FRIEDBERG, G. ENGELHARDT und F. MEINEKE, Int. Arch. Allergy 22, 166 (1963).

Summary. Cobra venom contains an anaphylatoxin-forming principle. This component has been purified by gel filtration and ion exchange chromatography. It has been obtained free from proteolytic or hemolytic activity as well as from phospholipase A. It seems to be an enzyme that splits the anaphylatoxin from its inactive precursor.

W. VOGT und G. SCHMIDT

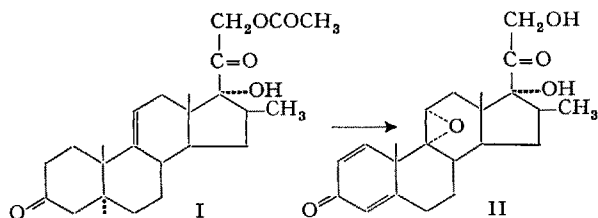
Pharmakologische Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen (Deutschland), 16. Dezember 1963.

⁸ *Nachtrag* (bei der Korrektur). Die Annahme, dass die Behandlung von Rattenplasma mit dem Cobraferment zum gleichen Anaphylatoxin führt wie nach Sephadex-Aktivierung, wurde inzwischen durch folgende Befunde weiter bestätigt: 1. Im Plasma von Ratten, die 140 min und 15 min vor der Blutentnahme das Cobraferment i. v. erhielten, konnte mit Sephadex kein Anaphylatoxin gebildet werden; 2. Wird Rattenplasma erst mit Sephadex und dann mit Cobraferment inkubiert, so entsteht nicht mehr Anaphylatoxin-Aktivität als nach Behandlung mit Cobraferment allein. Danach wird bei beiden anaphylatoxinbildenden Prozessen das gleiche Substrat verbraucht.

An Epoxidation by *Corynebacterium simplex*

An earlier communication from our laboratories¹ reported the microbiological dehydrogenation of 16 β -methyl-dihydrocortisone in the positions 1 and 4 by means of fermentation with *Corynebacterium simplex*. In continuation of this work further studies were undertaken concerning the dehydrogenation capacities of this bacterium strain in relation to other 16 β -methyl steroid compounds.

In this paper we wish to report the conversion of 16 β -methyl-5 α - Δ 9(11)-pregnene-17 α , 21-diol-3, 20-dione-21-acetate (I) into 16 β -methyl- Δ 1, 4-pregnadiene-9 α , 11 α -epoxy-17 α , 21-diol-3, 20-dione (II) by a strain of *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946).



Microbiological epoxidations of double bonds have been obtained previously². This reaction occurred only when unsaturated steroids were incubated with microorganisms capable of hydroxylating the corresponding saturated position. For instance *Curvularia lunata* or *Cunninghamella blakesleana* will convert Δ 4, 9(11)-pregnadiene-17 α , 21-diol-3, 20-dione into the corresponding 9 β , 11 β epoxide. The same two moulds, together with *Helicostylum piriforme*, *Mucor griseocyanus* or *Mucor parasiticus* were able to transform Δ 4, 14-pregnadiene-17 α , 21-diol-3, 20-dione into the corresponding 14 α , 15 α epoxide.

Up to date *Corynebacterium simplex* has been known only for its dehydrogenation capacity. The epoxidation of compound I in the position 9 α , 11 α represents a new type of microbial conversion by this microorganism. This bacterium could therefore be considered as a potential 11 α -hydroxylator. It is noteworthy that the epoxidation is accompanied by a dienization in the positions 1 and 4 of ring A. Besides compound II some fermentations yielded an additional steroid compound which appeared most probably to be 16 β -methyl- Δ 4-pregnene-9 α , 11 α -epoxy-17 α , 21-diol-3, 20-dione. Its significance either as an intermediate of the dienization or as a by-product is rather uncertain.

The fermentation was carried out as follows: one slant culture of *Corynebacterium simplex* was used to inoculate a 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of a liquid medium of the following composition: peptone 0.6%, casein 0.4%, yeast autolysate 0.3%, meat extract 0.15%, glucose 0.1%. After being incubated on a rotary shaker at 200 rpm and at a temperature of 27°C for 18 h, the contents of the flask served as inoculum for 4 l of the same medium in a glass jar. This broth was incubated at 28°C for 14 h under constant agitation at 500 rpm and aeration at a rate of 1 v/v per min. Subsequently 1.5 g of 16 β -methyl-5 α - Δ 9(11)-pregnene-17 α , 21-diol-3, 20-dione-21-acetate dissolved in 40 ml of methanol was added to the broth. The fermentation was continued for another 15 h

¹ D. KLUEPFEL and C. CORONELLI, Exper. 18, 441 (1962). A printing mistake occurred in this communication: the name of compound I should read 16 β -methyl-5 α -dihydrocortisone instead of 16 β -methyl-5 α -dehydrocortisone.

² B. M. BLOOM and G. M. SHULL, J. Amer. chem. Soc. 77, 5767 (1955).