

## Untersuchungen über die Reinigung des Protektins Anti-A<sub>hel</sub> (Anti-A<sub>HP</sub>) aus *Helix pomatia*

Das Protektin Anti-A<sub>hel</sub> (Anti-A<sub>HP</sub>) aus der Eiweissdrüse von *Helix pomatia* agglutiniert nicht nur Blutkörperchen der Gruppe A<sup>1,2</sup>, sondern darüber hinaus auch verschiedene Bakterienstämme: Einige Stämme von *E. coli* der Serotypen O<sub>26</sub>, O<sub>86</sub>, O<sub>111</sub> und O<sub>136</sub><sup>3</sup>, Salmonellen<sup>4</sup> sowie Streptokokken der Gruppe C<sup>5</sup>. Allen Gruppierungen, die mit Anti-A<sub>hel</sub> reagieren, ist endständiges N-Acetyl-D-Galactosamin gemeinsam<sup>6</sup>. Der Eiweissdrüsensextrakt ist ein Gemisch aus mehreren Komponenten, woraus sich das agglutinierende Prinzip anreichern bzw. abtrennen lässt.

**Material und Methoden.** Die Eiweissdrüsen der Schnecken werden zunächst lyophilisiert und pulverisiert. 3 g des Trockenpulvers werden mit 30 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und bei +4°C 16 h gerührt. Nach Zentrifugation (10 min bei 5000 U/min) wird der Rückstand erneut dieser Behandlung unterworfen. Selbst nach einer 3. Extraktion ist der Überstand noch agglutinationsfähig. Die vereinigten Überstände werden gegen destilliertes Wasser salzfrei dialysiert und lyophilisiert. Diese lyophilisierte Substanz wird im weiteren als Rohextrakt bezeichnet.

Fraktionierungen an DEAE-Zellulose, CM-Zellulose und Sephadex G 200 wurden durchgeführt. Als Kriterium für die Einheitlichkeit der einzelnen bei der Fraktionierung erhaltenen Gipfel zogen wir die Disk-Elektrophorese<sup>7,8</sup> als die derzeit leistungsfähigste Trennmethode heran. Weiterhin untersuchen wir die Agglutinationsfähigkeit. Dabei gilt als Standardkonzentration eine Einwaage von 10 mg lyophilisierter Substanz in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung. Die Agglutinationsstärke wird durch das Testen einer Verdünnungsreihe bestimmt, die mit einer Verdünnung von 1:10 beginnt und dann als Potenzreihe mit dem Faktor 1/2 fortgesetzt wird: 1:20, 40, 80, 160 ..., bis schliesslich keine Agglutination mehr eintritt.

1. Fraktionierung an DEAE-Zellulose. Säule 2,5 × 25 cm. Der Ionenaustauscher wird mit 0,005 M Puffer pH 7,0 äquilibriert. 300 mg lyophilisierten Rohextraktes, in etwa 50 ml des gleichen Puffers gelöst, werden auf die Säule aufgetragen. Die Elution wird mit 3 verschiedenen Puffern vorgenommen: a) 250 ml 0,005 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, pH 7,0; b) 250 ml 0,05 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, pH 7,0; c) 250 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O + 0,5 M NaCl, pH 7,0.

Die 3 Puffer werden in der angegebenen Reihenfolge nacheinander durch elektronisch gesteuerte Magnetventile auf die Säule gegeben. Die Extinktion des Eluates wird in einem UV-Durchflussabsorptiometer gemessen und registriert. Das Elutionsdiagramm zeigt 3 Gipfel. Der erste enthält die gesamte serologische Aktivität, während der zweite und dritte negativ sind bzw. nur Spuren zeigen. Die Fraktionen des ersten Peaks werden vereinigt, gegen destilliertes Wasser dialysiert und im Anschluss daran an CM-Zellulose fraktioniert (Figur 1).

2. Fraktionierung an CM-Zellulose. Säule 2,5 × 20 cm. Der Ionenaustauscher wird mit 0,005 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer, pH 4,0, äquilibriert. 300 mg Rohextrakt werden in ca. 50 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und auf die Säule aufgetragen. Elutionsprogramm: a) 250 ml 0,005 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, pH 4,0; b) 250 ml 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, pH 7,0; c) 250 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O + 0,5 M NaCl, pH 7,0.

Bei dieser chromatographischen Trennung erhält man 2 Gipfel etwa gleicher Grösse (Figur 2). Der zweite enthält die serologische Aktivität. Bei der Fraktionierung des an CM-Zellulose aktiven Gipfels an Sephadex G 200 ergibt sich ein überraschendes Bild: Es zeigt sich ein einziger Gipfel, der praktisch keine Agglutinationsfähigkeit be-

sitzt. Dieser Gipfel ergibt in der Disk-Elektrophorese nur noch eine einzige Bande. Das bedeutet, dass die zweite Komponente, die offenbar Träger des agglutinierenden Prinzips ist, vom Sephadex absorbiert wird. Im weiteren Verlauf der Elution zeigt sich bei einigen Fraktionen eine schwache Agglutinationsfähigkeit, obwohl das UV-Durchflussabsorptiometer kein Ansteigen der Extinktion registriert. Das bedeutet, dass die zweite Komponente, die offenbar an das Sephadex absorbiert ist, sehr stark verdünnt im Laufe der Zeit ausgewaschen wird. Die Elution des Protektins erfolgt dann entweder mit 6 M Harnstofflösung oder noch besser mit 0,5 M Glukose in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0. Das Protektin wandert mit der Glukosefront und erscheint als Gipfel im Eluat. Die Glukose wird durch Dialyse entfernt und die wässrige Lösung

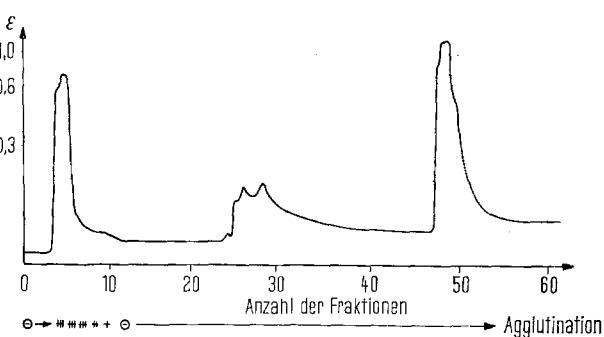


Fig. 1. Fraktionierung von *Helix pomatia* Rohextrakt an DEAE-Zellulose.

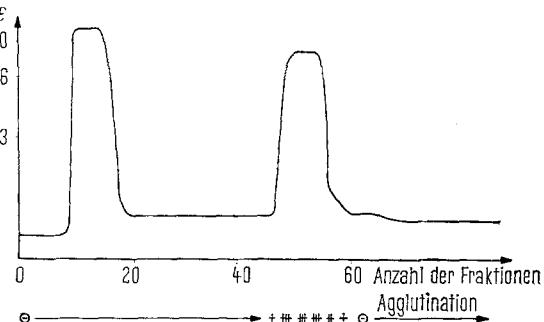


Fig. 2. Fraktionierung von *Helix pomatia* Rohextrakt an CM-Zellulose.

- O. PROKOP, A. RACKWITZ und D. SCHLESINGER, J. forens. Med. 12, 108 (1968).
- O. PROKOP, D. SCHLESINGER und A. RACKWITZ, Z. Immunforsch. exp. Ther. 129, 402 (1965).
- G. UHLENBRUCK, O. PROKOP und W. HAERLAND, Zentbl. Bakt. ParasitKde. I 199, 271 (1965).
- W. HAERLAND, O. PROKOP, G. UHLENBRUCK und J. ULRICH, Festschrift für Herbert Elbel, Lübeck 1967 (Vorgetragen von O. PROKOP, Tagung Dt. Ges. für Ger. Med., Freiburg 1966).
- W. KÖHLER und O. PROKOP, Z. Immunforsch. exp. Ther. 133, 50 (1967).
- G. UHLENBRUCK und O. PROKOP, Vox Sang. 11, 519 (1966).
- L. ORNSTEIN, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1967).
- B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964).

## Agglutinationsfähigkeit der einzelnen Fraktionsstufen gegen Streptokokken der Gruppe C

Verdünnung	1:10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
I Rohextrakt	+++	+++	++	+	+	—					
II Aktiver Gipfel der DEAE-Zellulose-Fraktionierung	++	++	++	+	+	+	±	—			
III Aktiver Gipfel der CM-Zellulose-Fraktionierung	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
IV Mit Glukoselösung an Sephadex G 200 eluiertes Protektin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	±

Jeweils 10 mg lyophilisierte Substanz in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst, von dieser Stammlösung eine Verdünnungsreihe in der oben angegebenen Weise angelegt und die einzelnen Stufen agglutiniert.

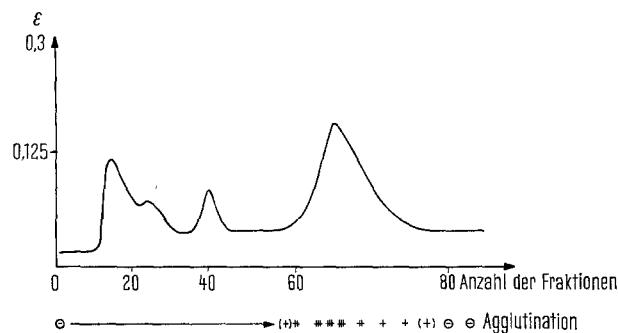


Fig. 3. Fraktionierung von *Helix pomatia* Rohextrakt an Sephadex G 200.

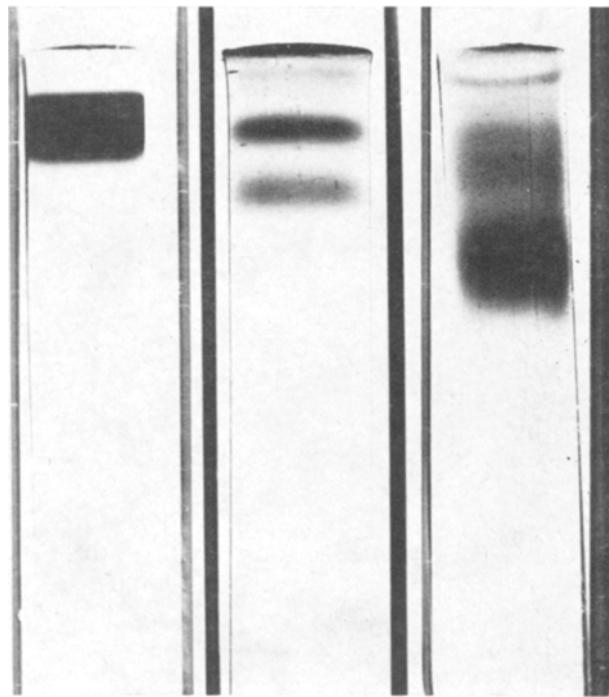


Fig. 4. Disk-Elektropherogramme der serologisch aktiven Gipfel von 1, 2 und 3 (von rechts nach links).

anschliessend lyophil getrocknet. In der Disk-Elektrophorese zeigt sich, dass diese Substanz als einheitliche Front wandert, das heisst, sie enthält keine weitere nachweisbare Komponente mehr. Auf dieser Basis bauten wir ein einfaches, aber sehr wirkungsvolles Reinigungsverfahren für das Protektin aus *Helix pomatia* auf: 200 mg lyophilisierten Rohextraktes werden in 3-4 ml 0,05 M Dinatriumhydrogenphosphat, pH 7,0, gelöst und auf eine Sephadex G 200 Säule (2,5 × 40 cm), die mit demselben Lösungsmittel äquilibriert ist, aufgetragen. Die Elution erfolgt zunächst mit 250 ml des gleichen Puffers. Dabei werden sämtliche anderen Komponenten, außer dem Protektin, aus der Säule ausgewaschen. Durch einen automatischen Umschalter wird die Säule mit dem zweiten Puffer-Reservoir, das 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0, mit 0,5 M Glukose enthält, verbunden. Dabei erscheint das in der Disk-Elektrophorese einheitliche Protektin mit der Glukosefront im Eluat, das mit einem UV-Durchflussabsorptiometer kontrolliert wird. Die Ausbeute beträgt nach Dialyse und Lyophilisation ungefähr 10 mg (Figur 3). Eine Fraktionierung des bereits an DEAE- und CM-Zellulose gereinigten Protektins an Biogel P-300 ergibt nur 1 Gipfel, dessen Agglutinationsfähigkeit jedoch noch voll erhalten ist, das heisst, es erfolgt keine weitere Auf trennung (Figur 4 und Tabelle).

**Summary.** A method is described which allows separation of the protectin Anti  $A_{hel}$  (Anti  $A_{HP}$ ) from crude extracts of the protein gland of *Helix pomatia*. A solution of the crude extract in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, is applied on a Sephadex G 200 column. The protectin is retained on the gel matrix, while the other components of the mixture are eluted. The protectin is eluted with a 0.5 M solution of glucose in buffer, and is isolated by dialyzation against aqua dest. and lyophilization.

O. KÜHNEMUND und W. KÖHLER<sup>9</sup>

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,  
Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie,  
69 Jena (DDR), 3. Februar 1969.

<sup>9</sup> Frau R. JOHN und Frau B. HOFFMANN sind wir für die gewissenhafte Durchführung der experimentellen Arbeiten zu Dank verpflichtet.