

Immunologisch aktive Glykoproteine aus *Baptisia tinctoria*

Immunologically Active Glycoproteins from *Baptisia tinctoria*

Norbert Beuscher^{1,2}, Karl-Heinz Scheit³, Cornelia Bodinet¹, und Lothar Kopanski¹

¹ Fa. Schaper und Brümmer, Forschung und Entwicklung, Bahnhofstraße 35, D-3320 Salzgitter 61 (Ringelheim), Federal Republic of Germany

² Address for correspondence

³ Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abt. Molekulare Biologie, Am Faßberg, D-3400 Göttingen, Federal Republic of Germany

Received: September 26, 1988

Abstract

Chromatographically purified fractions of aqueous-ethanolic extracts from *Baptisia tinctoria* roots contained a strong lymphocyte DNA synthesis-stimulating activity. Electrophoretic analysis of these fractions revealed four distinct protein bands with molecular masses of P 1 = 58 kD; P 4 = 31 kD; P 5 = 26 kD; and P 6 = 14 kD. They contained carbohydrate as determined by periodic acid Schiff staining. An estimation of the approximate amount of sugar was done by using human transferrin as a reference, this method revealed the following values: P 1 = 27 %; P 4 = 12 %; P 5 = 14 %; and P 6 = 8 %. The mixture of proteins and every single band were immunoreactive with a polyclonal antiserum against *Baptisia* proteins determined in immune and dot blots, respectively. Electrophoretically purified proteins were characterized by tryptic cleavage and determination of their amino acid content. They contained several common amino acids, predominantly aspartic acid, glutamic acid, threonine, and alanine. The content of glucosamine and/or galactosamine was less than 0.2 Molar per cent. The four proteins revealed pI values between 5.3 and 4.7. Protein P 4 was immunochemically related to phytohemagglutinin but, in contrast to PHA-P, it exhibited no hemagglutinating activity and no leucagglutinating activity like PHA-L.

Einleitung

In früheren Arbeiten beschrieben wir den Einfluß von Inhaltsstoffen aus *Baptisia tinctoria* auf die Immunantwort von Lymphozyten am Beispiel der Mitogenstimulation und der Antikörperproduktion (1, 4). Diese beobachteten immunologischen Aktivitäten ordneten wir den in unseren Fraktionen enthaltenen Polysacchariden zu, da für Polysaccharid-Fractionen aus *Baptisia tinctoria* und aus einer Reihe anderer höherer Pflanzen eine immunmodulierende Aktivität beschrieben worden war (2, 3). Eigene Analysen mittels ¹³C-NMR bestätigten die Existenz eines Arabinogalaktans als Bestandteil der genannten Fraktionen (4).

Im Lymphozytentransformationstest war jedoch bereits damals die Kinetik dieser Fraktionen auffällig, weil sie durch ihren Verlauf die Vermutung aufkommen ließ, daß eine in geringeren Mengen enthaltene Komponente für die Aktivierung verantwortlich sein könnte (1). Es wurden nun unter den Inhaltsstoffen Proteine nachgewiesen, die Glykoprotein-Charakter besitzen.

In der vorliegenden Arbeit werden diese Glykoproteine aus *Baptisia tinctoria* chemisch und biologisch charakterisiert.

Material und Methoden

Extraktion der verwendeten Droge

Für die Anreicherungen wurde Handelsdroge von *Baptisia tinctoriae* radix aus einer Lieferung von 482 kg der Fa. Worlee, Hamburg, eingesetzt. Ein Drogenmuster wurde zurückgelegt. Die Extrakte wurden entweder durch zehntägige Mazeration von jeweils 50 g Drogenmaterial mit 500 ml 30 Vol. % Ethanol erhalten (analytisch) oder aus 20 kg Droge mit 200 l 30 Vol. % Methanol (präparativ) gewonnen, eingeeengt und lyophilisiert.

Gewinnung immunologisch aktiver Substanzen

Die Voranreicherung der Makromoleküle erfolgte durch Ultrafiltrationen an Hollow-Fiber Patronen der Firma Amicon (analytischer Maßstab) bzw. präparativ an einem Spiralmodul der Firma Millipore gegen dest H₂O bei 4 °C; die Ausschlußgrenze lag jeweils bei 10 000 Dalton. Aus Lyophilisaten der 50 g Drogensätze ließen sich Ausbeuten von 130 bis 168 mg an Makromolekülen erzielen; 500 g Lyophilisat aus dem 20 kg-Ansatz von *Baptisia* lieferten 11.55 g an Makromolekülen. Die Säulenchromatographie dieser Substanzen an Sephadex G-50 medium (Pharmacia) als Trenngel wurde wie in einer früheren Arbeit beschrieben durchgeführt (1). Sämtliche Fraktionen wurden vor der weiteren Analyse lyophilisiert.

Mitogenstimulation

Die biologische Testung der verschiedenen Fraktionen wurde ebenfalls bereits früher beschrieben (1).

Hämolytischer Plaquetest

Die Bildung von 19 S Hämolytinen (IgM) durch Antigen-stimulierte Milzzellen der Maus wurde im hämolytischen Plaquetest nach Jerne (23) nachgewiesen.

Elektrophorese

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach der Vorschrift von Laemmli (6). Bei der 2 D-Gelelektrophorese wurde die Trennung in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung und in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE durchgeführt. Es handelt sich um eine Modifikation der Methode von O'Farrell (7). Zur Abschätzung der Molekulargewichte wurden Rainbow™ Protein Marker (Fa. Amersham) bzw. der Marker SDS-7 (Sigma) eingesetzt. Der Glykoprotein-Nachweis in Polyacrylamidgelen wurde mit Schiff's Reagenz nach den Methoden von Fairbanks bzw. Glossmann durchgeführt (14, 16). Die Bestimmung des Zuckergehaltes erfolgte nach der Methode von Nowak, durch Vergleich mit humanem Transferrin, welches einen Zuckeranteil von 4 % (g/100 g) besitzt (17).

Aminosäureanalyse, tryptische Spaltung

Die Proben wurden in 6 M HCl 24 h bei 110 °C hydrolysiert. Die Analyse der Aminosäuregemische erfolgte mit einem LKB Modell 4151 Alpha Plus Aminosäureanalysator. Zur tryptischen Spaltung wurde die Probe in 0.1 M NaHCO₃ gelöst, mit Trypsin im Gewichtsverhältnis 1 : 100 versetzt und 15 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Mischung lyophilisiert und die tryptischen Peptide durch HPLC an reversed-phase C₁₈-Säulen (Macherey & Nagel, 240 × 5 mm) getrennt.

Quantitative Bestimmung von Glykoproteinen

Die quantitative Bestimmung von Glykoproteinen erfolgte mit Hilfe eines kompetitiven ELISA (8). Im ersten Schritt wurden *Baptisia*-Glykoproteine an den Boden der Mikrotiterplatten gebunden. Danach erfolgte eine Inkubation über 20 h bei 4 °C. Die Platten wurden dann dreimal mit 0.05 % Tween-20 (w/v) in phosphatgepufferter Saline gewaschen und anschließend mit einer 4 % Rinderserumalbumin-Lösung abgesättigt. Nach nochmaligem Waschen mit PBS-Tween wurden je 50 µl einer Testsubstanz plus Antiserum pro Napf einpipetiert. Danach erfolgte Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur und anschließend 3 × Waschen mit PBS-Tween. Anschließend wurden pro Napf 50 µl einer 1 : 1000-Verdünnung des Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen-Ig-Antikörpers hinzugegeben. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden 200 µl ABTS-Lösung (Amersham) pro Napf zugegeben und nach 15minütiger Reaktion mit 0.5 M Citronensäure abgestoppt. Die optische Dichte wurde bei 405 nm mit einem EIA-Reader (Bio-Rad) gemessen. Der Glykoproteingehalt der Testsubstanzen wurde aus Kompetitionsansätzen mit einem hochgereinigten Eichstandard mittels einer ELISA Data Analysis Software EIA 3.00/IBM/P berechnet. Protein wurde nach der Methode von Lowry et al. bestimmt (9).

Dot-Blot

Der Dot-Blot wurde in einer Bio-Rad Dot-Blot-Kammer auf Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll BA 85) nach der Methode von Hawkes durchgeführt (5).

Immun Blot

Die Durchführung von Immun Blots erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Debus (12). Die Proteine wurden in einer Elektrophoretokammer mit Graphit-Platten 2 Stunden bei 150 Volt auf Immobilon Membranen (Millipore) gebロットet. Die Membranen wurden dann halbiert, die eine Hälfte mit Aurodye angefärbt und die andere 5 × mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation in 10 % Pferdeserum (v/v) PBS. Nach 5 × Waschen erfolgte über 15 Stunden Inkubation mit dem Antiserum. Entwickelt wurden die Banden durch Reaktion mit Peroxidase-anti-Kaninchen-IgG in Pferdeserum/PBS 1 : 1000. Nach 5 × Waschen wurde für 15 Sekunden mit 3 ml einer Lösung aus 0.3 % 4-Chlor-1-naphtol in Methanol, 20 µl H₂O₂ und PBS ad 50 ml gefärbt.

HPLC

Es wurde eine LKB-Anlage mit Titandoppelkolbenpumpe, Modell 2150, in Verbindung mit einem Modell 2151 Controller verwendet. Die Trennung erfolgte an analytischen C₁₈-Säulen (240 × 5 mm) bei einem Fluß von 1 ml/min. Als Lösungsmittel A diente 0.1 % Trifluoressigsäure, als Lösungsmittel B 60 % Acetonitril in 0.1 % Trifluoressigsäure. Das Absorptionsprofil wurde bei 230 nm verfolgt.

Ergebnisse

Für den Nachweis von Proteinen in Extrakten der verschiedensten Genese ist die SDS-Elektrophorese eine geeignete Methode. Die aus den Wurzeln von *Baptisia tinctoria* gewonnenen hochmolekularen Inhaltsstoffe wurden in der SDS-Elektrophorese analysiert. Das Ergebnis ist auf der Bahn 5 der Abbildung 1 zu sehen. Es sind vier deutliche Proteinbanden zu erkennen, die mit Hilfe der daneben getrennten Marker-Proteine nach ihrem Molekulargewicht einzuordnen sind. Drei Proteinbanden liegen im Bereich 32–25 kD und eine weitere bei 14 kD. Mit der empfindlicheren Silberfärbung sind noch wesentlich mehr Proteine nachweisbar, wie auf Bahn 2 der Abbildung 5 zu erkennen ist.

Durch Chromatographie der vorangereicherten Makromoleküle an Sephadex G-50 wurden diese Banden in den entsprechenden Fraktionen 1 und 2 weiter angereichert. Der Proteingehalt lag in diesen Fraktionen bei 200 bzw. 180 µg/mg Lyophilisat. In den übrigen beiden Fraktionen fiel der Proteingehalt (148 bzw. 116 µg/mg) weiter ab. Auf Bahn 4 ist bereits keine Proteinbande mehr mit Coomassie-Blue anfärbbar.

Es war nun die Frage zu klären, in welchen Fraktionen die mitogenstimulierende Aktivität zu finden sein würde. Diese Frage konnte im Lymphozytentransformationstest dahingehend beantwortet werden, daß nur in den Fraktionen 1 und 2 signifikante Aktivität vorhanden war. In Abbildung 2 ist zu sehen, daß bei 1000 bis 500 µg/ml für die Fraktion 1 ein Maximum an Aktivität vorliegt. Für die Fraktion 2 war die Stimulationskinetik prinzipiell sehr ähnlich, wenn auch auf niedrigerem Niveau. Um dem Einwand zu begegnen, daß die beobachtete Stimulation auf eine eventuelle Kontamination der Fraktionen mit bakteriellen Lipopolysacchariden zurückzuführen sei, wurde die Testung an Milzzellen von C3H/HeJ-Mäusen wiederholt (Abb. 3A). Diese Zellen sind als LPS low-responder bzw. als LPS-resistent beschrieben (21, 22). Die glykoproteinhaltige Fraktion ergab auch hier eine Stimulation mit ähnlicher Kinetik wie bei NMRI-Mäusen, während die LPS-Kontrolle sich im Bereich der unbehandelten Kontrolle bewegte. Eine Vorbehandlung der Glykoprotein-Fraktion mit einem Antiserum, wie es auch im ELISA eingesetzt wurde, führte zu einer nahezu vollständigen Beseitigung der biologischen Aktivität (Abb. 3B). Bei den Kombinationsansätzen mit LPS beseitigte das Antiserum nur die zusätzliche Glykoprotein-Aktivität; die LPS-Aktivität blieb gegenüber dem Vergleichsansatz unverändert.

Wie wir in weiteren Untersuchungen zeigen konnten, ist diese gemessene Stimulation der DNS-Synthese mit einer vermehrten Bildung von Antikörpern der IgM-Klasse korreliert. Dieses Ergebnis lieferte der Jerne Plaque-Test ohne Zusatz von Protein A (Abb. 4).

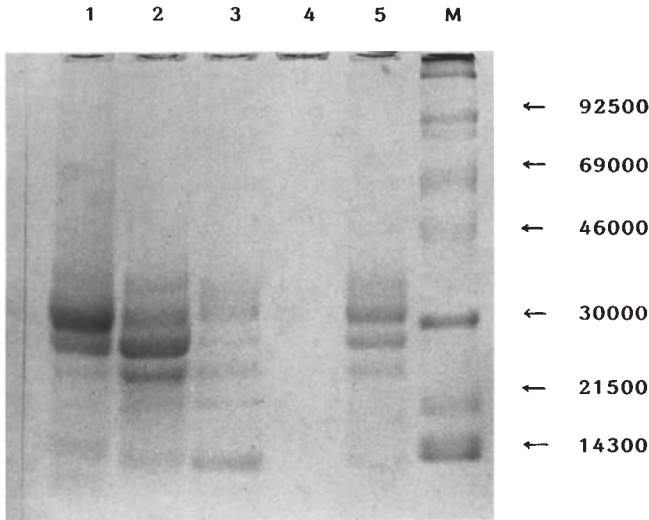


Abb. 1 SDS-Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen aus Extrakten von *Baptisia tinctoria*. Auf den Bahnen 1–4 wurden die Fraktionen 1–4 einer Sephadex G-50 Chromatographie aufgetragen; auf Bahn 5 das durch Diafiltration angereicherte Ausgangsmaterial von *Baptisia tinctoria*; Auftragsmenge jeweils 100 µg Lyophilisat. Mit M wurden die Molekulargewichtsmarkerproteine bezeichnet, von diesem Gemisch wurden 5 µl aufgetragen. Es handelt sich um Proteine mit dem Molekulargewicht 92,5 kD, 69 kD, 46 kD, 30 kD, 21,5 kD und 14,3 kD.

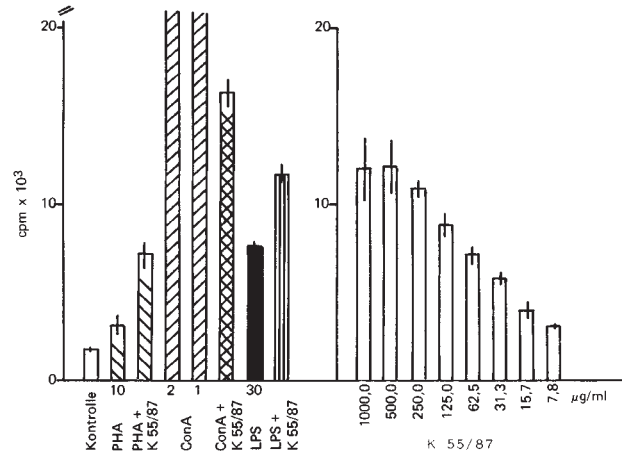


Abb. 2 Mitogene Stimulation von Milzlymphozyten aus NMRI-Mäusen. $6\text{-}[^3\text{H}]\text{-Thymidin}$ -Einbaureate einer unbehandelten Kontrolle im Vergleich zu Referenzmitogenen, Concanavalin A, Lipopolysaccharid, Phytämagglutinin, und den angegebenen Mengen der Fraktion 1 (Code-Nr. K 55/87). Die Kombinationsansätze von Referenzmitogenen und Prüfsubstanz enthalten die gleichen Mengen an Mitogenen sowie zusätzlich 1000 µg/ml der Fraktion 1.

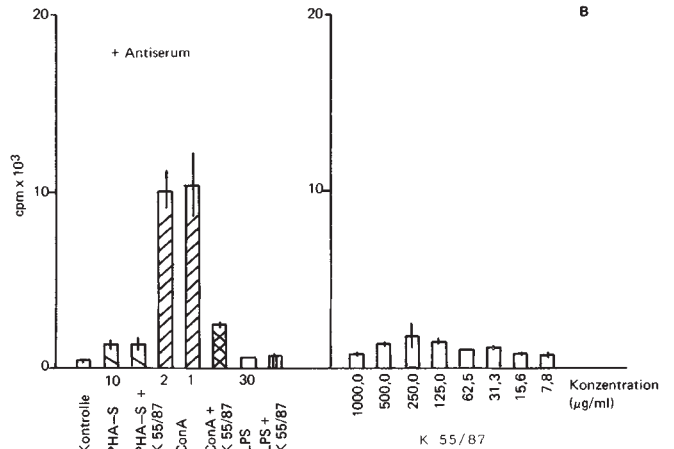
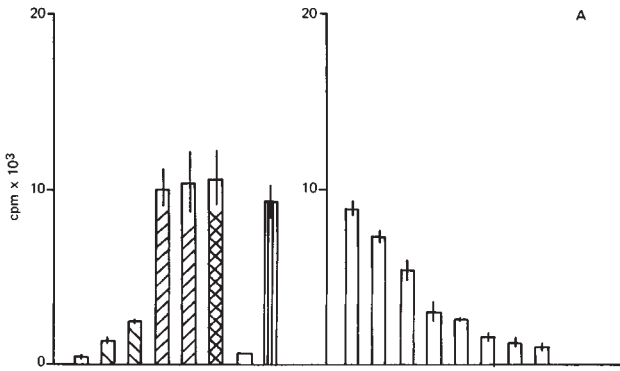


Abb. 3A und B Mitogene Stimulation von Milzlymphozyten aus C3H/HeJ-Mäusen. $6\text{-}[^3\text{H}]\text{-Thymidin}$ -Einbaureate einer unbehandelten Kontrolle im Vergleich zu Referenzmitogenen, Concanavalin A, Lipopolysaccharid, Phytämagglutinin, und den angegebenen Mengen der Fraktion 1 (Code-Nr. K 55/87). Die

Kombinationsansätze von Referenzmitogenen und Prüfsubstanz enthalten die gleichen Mengen an Mitogen sowie zusätzlich 1000 µg/ml der Fraktion 1. In Abb. 3B sind identische Experimente dargestellt, in denen lediglich eine Vorinkubation mit Antiserum gegen *Baptisia*-Glykoproteine erfolgte.

	Sephadex G-50 Trennung				
	<i>Baptisia t.</i> Retentat	Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. IV
Glykoprotein- gehalt [µg / mg]	420 ± 42	> 1000	449 ± 79	202 ± 9,5	106 ± 26

Die quantitative Bestimmung erfolgte gegen einen gereinigten Glykoprotein-Eichstandard aus *Baptisia tinctoria*. Der Bereich der Eichkurve lag zwischen 1 und 1000 µg.

Table 1 Bestimmung von Glykoproteinen im Enzym-Immunoassay.

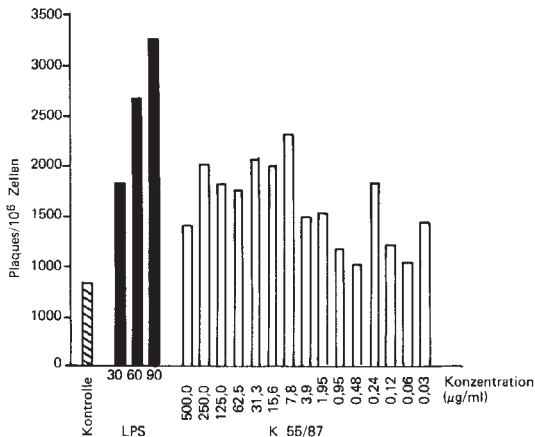


Abb. 4 Stimulation der Bildung hämolytischer Antikörper gegen Schaferythrozyten durch *Baptisia* Glykoproteine. Neben einer Kontrolle, die nur mit Schaferythrozyten inkubiert wurde, sind die Ergebnisse der positiven Referenz Lipopolysaccharid sowie der *Baptisia* Fraktion 1 (K 55/87) dargestellt.

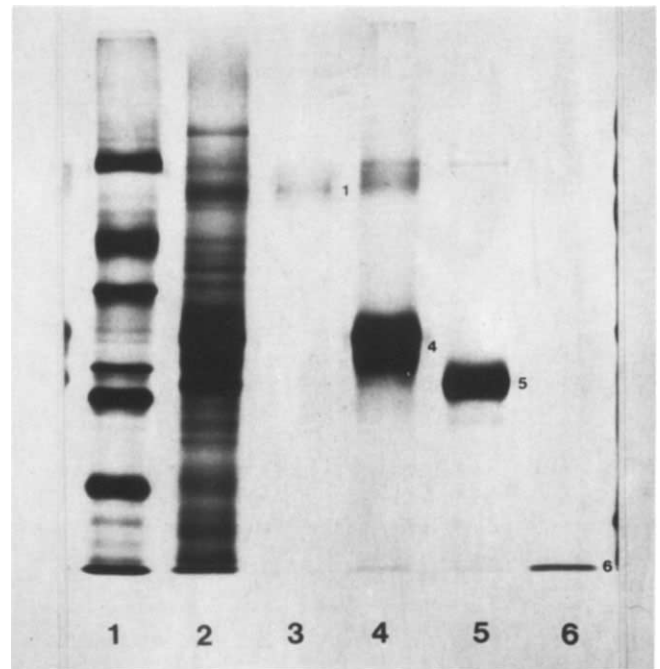


Abb. 5 SDS-PAGE von *Baptisia tinctoria* Gesamtprotein und Einzelfraktionen. Auftrennung in einem 12.5% SDS-Gel, Anfärbung mit Coomassie-Blue und Silber. **Bahn 1:** Markerproteine mit den Molekulargewichten 66 kD; 45 kD; 35 kD; 29 kD; 24 kD; 18.5 kD; 14.3 kD (von oben nach unten). **Bahn 2:** *Baptisia* Gesamtproteine. **Bahn 3:** Fraktion P 1. **Bahn 4:** Fraktion P 4. **Bahn 5:** Fraktion P 5. **Bahn 6:** Fraktion P 6.

Table 2 Aminosäure-Zusammensetzung von *Baptisia tinctoria*-Proteinen.

Aminosäure	P 1	P 4	P 5 (Mol-%)	P 6
Asp	15.6	19.2	15	12.1
Thr	10.1	9.4	6.3	6.9
Ser	8.7	11.2	8.3	5.2
Glu	9.5	10.9	10	13.8
Pro	6.14	4.3	6.9	5.2
Ala	9.5	9.1	11.3	11.03
Val	7	8	7.5	11.03
Met	0.84	0.4	—	1.7
Ile	5.03	2.9	5.6	6.9
Leu	8.1	10.5	9.4	6.9
Tyr	4.5	2.9	3	5.2
Phe	6.14	4.3	6.3	3.4
His	1.7	1.1	1.3	1.7
Lys	4.2	4	4.4	8.6
Arg	3.1	1.8	2.5	1.7

Neben der Bestimmung der biologischen Aktivität dieser Fraktion interessierte ferner, ob auch ein immunchemischer Nachweis der Glykoproteine möglich sein würde. Hierzu wurde ein polyvalentes Antiserum vom Kaninchen gegen die hochgereinigte Wirkfraktion aus *Baptisia tinctoria* eingesetzt. Dieses Antiserum wurde auch für die quantitative Bestimmung von Wirkstoffen im Enzym-Immunoassay verwendet (Tab. 1). Dieser Test bestätigte mit den erhaltenen Werten die Ergebnisse der biologischen Tests, d. h. quantitative Bestimmung und Aktivität korrelierten.

Im Immun Blot ergab sich eine deutliche Reaktion mit dem Antiserum bis zu einer Konzentration von 0.31 µg Lyophilisat. Damit war klar, daß es sich bei den aktiven Komponenten um Proteine handeln mußte.

Für die weitere Aufarbeitung wurden die beiden Fraktionen mit biologischer Aktivität (1 und 2) vereinigt und durch präparative SDS-PAGE in 6 Proteinbanden aufgetrennt. Für die weitere Aufarbeitung reichten die Proteinbanden 2 und 3 mengenmäßig nicht aus und konnten daher nicht berücksichtigt werden.

Die präparativ-elektrophoretisch gewonnenen Proteine wurden in der analytischen SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft (Abb. 5). Das Ergebnis für die vier Hauptproteine (P 1, P 4, P 5 und P 6) ist in den Bahnen 3–6 zu erkennen. Protein P 1 ist auf dieser Abbildung nur schwach zu erkennen, da die Fraktion nur geringe Mengen davon enthielt.

Protein P 4 enthielt zwei eng beieinander liegende Proteine, die nicht zu trennen waren. Die Proteine P 5 und P 6 waren dagegen sehr homogen. Die nur durch die Silberfärbung sichtbar gewordenen Verunreinigungen der Proteine P 4 und P 5 machen sicher weniger als 5% aus.

Mit Hilfe der in Bahn 1 aufgetrennten Markerproteine ließen sich für die gereinigten Proteine folgende Molekulargewichte abschätzen: P 1 = 58 kD; P 4 = 31 + 29 kD; P 5 = 26 kD und P 6 = 14 kD. Diese Werte stimmen recht genau mit den in Abbildung 1 genannten Molekulargewichten überein. Eine Inkubation der Gele mit Periodat Schiffs Reagenz ergab

eine Anfärbung aller Proteinbanden, die damit als Glykoproteine zu bezeichnen waren. Die Abschätzung des Zuckergehaltes erfolgte durch Vergleich mit humanem Transferrin, das einen bekannten Zuckeranteil von 4 % (g/100 g) besitzt. Dabei wurden für P 1 = 27 %; P 4 = 12 %; P 5 = 14 % und für P 6 = 8 % ermittelt.

Als ein weiterer Schritt zur Charakterisierung der Proteinfractionen wurde die Aminosäureanalyse unternommen (Tab. 2). Bei der Aminosäureanalyse wurden Cystein und Tryptophan nicht bestimmt. Aus dem Verhältnis Asp/Glu geht eindeutig die Verschiedenheit der Proteine P 1, P 4 und P 6 voneinander hervor. Den Unterschied zu Protein P 5 weist dagegen schon die Abwesenheit von Methionin aus.

Die Aminosäure Galaktosamin und Glucosamin ließen sich im Hydrolysat sauber von allen anderen Aminosäuren abtrennen und dadurch mit der gleichen Empfindlichkeit wie Aminosäuren nachweisen. Die Nachweisgrenze für die Aminosäure Methionin lag bei < 0.2 Mol-%, die Nachweisgrenze für die Aminosäure Galaktosamin war entsprechend.

Aufgrund der Aminosäure-Aminosäureanalyse konnte nachgewiesen werden, daß der Anteil an Glucosamin und/oder Galaktosamin in den untersuchten Proteinfractionen < 0.2 Mol-% betragen muß.

Das Gemisch der *Baptisia*-Proteine wurde ferner durch 2 D-Gelelektrophorese nach Ladung und Molekulargewicht getrennt. Zum Vergleich wurde PHA ebenfalls eingesetzt. Dieses Verfahren ermöglichte auch die Bestimmung der pI-Werte der *Baptisia*-Proteine. Die *Baptisia*-Proteine wiesen pI-Werte im Bereich von 5.3–4.7 auf, stellten also durchweg saure Proteine dar. In diesem Experiment zeigte PHA zwei Untereinheiten mit pI-Werten von 5.3 und 4.7. Auch die Mischung der *Baptisia*-Proteine zeigte zwei Spezies mit pI-Werten von 5.3 und 4.7 (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Weiterhin wurde das Gemisch der *Baptisia*-Proteine sowie die isolierte Fraktion P 4 immunologisch charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden die Proteine zunächst durch SDS-PAGE getrennt und danach die getrennten Proteinbanden auf Nitrozellulosemembran geblotet.

Ein außerdem durchgeführter Dot-Blot mit *Baptisia*-Proteinen, ConA und PHA, zeigte, daß eine immunologische Verwandtschaft zwischen PHA und P 4, nicht aber zwischen P 4 und ConA bestand.

Diskussion

Die von uns bereits früher beschriebene polyclonale B-Zellaktivierung der Maus durch Inhaltsstoffe der Heilpflanze *Baptisia tinctoria* konnte bestätigt und mit einer Gruppe von vier dominierenden Glykoproteinen in Verbindung gebracht werden. Der Zuckergehalt dieser einzelnen Glykoproteine lag zwischen 8 und 27 % und bewegte sich damit innerhalb des für pflanzliche Glykoproteine bekannten Rahmens. Eine Reihe von pflanzlichen Lektinen besitzt dagegen keinen kovalent gebundenen Zucker (z. B. ConA) und sind somit keine Glykoproteine. Das Fehlen des Zuckeranteils spielt jedoch keine Rolle in bezug auf ihre biologische Aktivität (15).

Der Nachweis von Glykoproteinen wurde mittels SDS-PAGE, 2 D-Elektrophorese, Western Blot und Immun Blot geführt. Durch Entwicklung von Antisera gegen hochgereinigte Glykoprotein-Fractionen von *Baptisia tinctoria* im Kaninchen war es möglich, diese Substanzen auch quantitativ zu bestimmen.

Extrakte wie auch hochgereinigte Fractionen wurden im Enzym-Immunoassay vermessen und ihr Gehalt an Glykoproteinen anhand eines hochgereinigten Eichstandards ermittelt. Das gleiche Antiserum war ebenfalls in der Lage, die biologische Aktivität in der Mitogenstimulation aufzuheben.

Bei unseren Lymphozyten-Transformationsexperimenten fiel auf, daß sowohl PHA-P als auch PHA-S bei den verwendeten Milzzellen von NMRI-Mäusen im Unterschied zu den Glykoproteinen aus *Baptisia tinctoria*, nur eine geringe Stimulation bewirkten. Dieses Phänomen ist offensichtlich stammesspezifisch, da bei Milzzellen von C3H-HeJ-, CBA/J- und Balb/c-Mäusen für beide Substanzen gute Stimulationsergebnisse beobachtet wurden. Wie in einer früheren Arbeit wurde auch hier der Nachweis geführt, daß es sich nicht um einen LPS-Effekt handelt (1).

Wir konnten darüber hinaus zeigen, daß die Lymphozyten-Aktivierung nicht nur mit vermehrter DNS-Synthese, sondern auch mit gesteigerter Immunglobulinsynthese (IgM) verbunden ist.

Dieser Befund ist insofern von Wichtigkeit, weil das einzige Unterscheidungsmerkmal zwischen einer ruhenden und einer aktivierten B-Zelle das Maß der Antikörperproduktion ist. Alle polyclonal stimulierbaren B-Zellen sind kleine Lymphozyten und sezernieren mit niedriger Rate 19 S IgM-Moleküle (10). Es ist ferner bekannt, daß eine polyclonale B-Zellaktivierung unspezifisch und direkt erfolgt, ohne die Mitwirkung von Helferzellen. Es werden aber nicht alle B-Zellen stimuliert, wie das Beispiel des LPS zeigt, sondern nur bestimmte T-Zell-unabhängige B-Zellklone (13).

Die Interaktion erfolgt an definierten Positionen der B-Zell-Oberfläche, und zwar nicht an den Immunglobulin-Rezeptoren (11). Unsere Ergebnisse zeigen, daß Glykoproteine aus *Baptisia tinctoria* eine Aktivierung in der zuvor beschriebenen Weise bewirken. Ein Zusatz von *Baptisia*-Glykoproteinen zum ConA-Ansatz bewirkt eine Hemmung der Mitogenstimulation durch dieses Lektin. Dies zeigt, daß beide Substanzen an gleichen Strukturen der Lymphozytenoberfläche binden. Diese Bindung ist Voraussetzung für die mitogene Wirkung. Wenn dagegen *Baptisia*-Glykoproteine zum LPS-Ansatz gegeben werden, erfolgt keine Hemmung, sondern eine Steigerung der Lymphozytenaktivität. Daraus ist zu schließen, daß hier eine solche ähnliche Zuckerbindungsspezifität nicht vorliegt.

Trotz der beobachteten immunchemischen Ähnlichkeit zwischen PHA-S und *Baptisia*-Glykoprotein P 4 liegen Unterschiede in der biologischen Wirkung vor. Außerdem ist zu erwähnen, daß die *Baptisia*-Proteine B-Zellen aktivieren, während PHA wie ConA als T-Zell-Mitogen gilt.

Die von uns untersuchten Glykoproteine besitzen im Gegensatz zum PHA keine leuko- und hämagglutinierenden Eigenschaften für Kaninchen-, Schaf- und humane Erythrozyten. Dies wurde für einen Konzentrationsbereich von 1–1000 µg/ml ausgetestet, wobei durch Zusatz von Rinderserumalbumin bzw. Human-Plasma eventuelle inkomplette agglutinierende Eigenschaften des Proteins kompensiert wurden.

Die für die immunologischen Untersuchungen eingesetzten Antiseren erkennen alle Glykoproteine des Gemischs sowohl in angereicherten als auch in hochgereinigten Fraktionen.

Die Fähigkeit zur Lymphozytenstimulation war auf solche Fraktionen beschränkt, die sowohl im Enzym-Immunoassay, in der Elektrophorese und in der Proteinbestimmung Wirksubstanzen anzeigten. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der Glykoproteine. Fraktionen ohne elektrophoretisch nachweisbares Protein waren nicht aktiv. Dieses Ergebnis ähnelt den von Shida, Yagi und Suzuki berichteten Verhältnissen bei *Aloe arborescens* (18, 19, 20). Von diesen Autoren wurden in biologisch aktiven Fraktionen neben drei Polysacchariden auch mehrere Glykoproteine nachgewiesen. Von diesen hatte das Glykoprotein A im Vergleich zu den Polysacchariden eine signifikant höhere phyzytosestimulierende Aktivität. Wie bei *Aloe*, so ist auch bei *Baptisia* davon auszugehen, daß neben den früher beschriebenen Polysacchariden auch Glykoproteine an der immunmodulierenden Aktivität beteiligt sind.

Die weiteren Arbeiten werden darauf ausgerichtet sein, Antiseren zu entwickeln, die getrennte Erfassung von Glykoproteinen bzw. Polysacchariden ermöglichen. Außerdem ist zum weiteren Nachweis des Glykoproteincharakters eine Isolierung von Glykopeptiden aus den entsprechenden Spaltprodukten der beschriebenen Proteine geplant sowie eine exakte Zuckerbestimmung.

Literatur

- ¹ Beuscher, N., Kopanski, L. (1985) *Planta Med.* 51, 381.
- ² Wagner, H., Proksch, A., Riess-Maurer, I., Vollmar, A., Odenthal, S., Stuppner, H., Jurcic, K., Le Turdu, M., Heur, Y. H. (1984) *Arzneim.-Forsch.* 34, 659.
- ³ Kumazawa, Y., Mizunoe, K., Otsuka, Y. (1982) *Immunology* 47, 75.
- ⁴ Beuscher, N., Kopanski, L., Ernwein, C. (1987) *Advances in the Bio-sciences* 68, 329.
- ⁵ Hawkes, R., Niday, E., Gordon, J. (1982) *Anal. Biochem.* 119, 142.
- ⁶ Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680.
- ⁷ O'Farrell, P. H. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4007.
- ⁸ Matthew, W. D., Sandrock, Jr., A. W. (1987) *J. Immunol. Meth.* 100, 73.
- ⁹ Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- ¹⁰ Melchers, F., Lafleur, L., Andersson, J. (1974) In: *Control of Prolife-ration in Animal Cells* (Clarkson, B., Basenga, R., eds.), Cold Spring Harbour Lab., p. 393.
- ¹¹ Coutinho, A., Möller, G. (1975) *Adv. Immunol.* 21, 113.
- ¹² Debus, E., Flügge, G., Weber, K., Osborn, M. (1982) *EMBO J.* 1, 41.
- ¹³ Klaus, G. G. B., Janossy, G., Humphrey, J. H. (1975) *Eur. J. Immunol.* 5, 105.
- ¹⁴ Fairbanks, G., Steck, T. L., Wallach, D. F. H. (1971) *Biochem.* 10, 2606.
- ¹⁵ Sharon, N. (1974) *Ann. Proc. Phytochem. Soc.* 10, 235.
- ¹⁶ Glossmann, H., Neville, D. M. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6339.
- ¹⁷ Nowak, T. P., Barondes, S.H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 393, 115.
- ¹⁸ Shida, T., Yagi, A., Nishimura, H., Nishioka, I. (1985) *Planta Med.* 51, 273.
- ¹⁹ Yagi, A., Nishimura, H., Shida, T., Nishioka, I. (1986) *Planta Med.* 52, 213.
- ²⁰ Suzuki, I., Saito, H., Inoue, S., Migita, S., Takahashi, T. (1979) *J. Bio-chem.* 85, 163.
- ²¹ Coutinho, A., Gronowicz, E., Sultzer, B. M. (1975) *Scand. J. Immu-nol.* 4, 139.
- ²² Skidmore, B. J., Morrison, D. C., Chiller, J. M., Weigle, W. O. (1975) *J. Exp. Med.* 142, 1488.
- ²³ Jerne, N. K., Nordin, A. A. (1963) *Science* 140, 405.