Gruppe Nr.	Verabreichte Substanz	Dosis	Mutter- tiere	Implan- tationen	Resorptionen			Feten	
					I	R	R I [%]	Gesamt	Mißgebildet
								F	M F [%]
I	<i>N</i> -Phthalyl-DL-isoglutamin ^a	50 mg/kg	3	39	5	12,8		34	0
		100 mg/kg	5	58	18	31,0		40	2
		200 mg/kg	5	67	29	43,3		38	4
II	DL-Isoglutamin ^b	400 mg/kg	5	64	5	7,8		59	0
		800 mg/kg	4	39	6	15,4		33	0
III	Physiolog. NaCl-Lösung/ Tween 20 (3 : 1)	40 ml/kg	15	201	13	6,5		188	0
IV	(Normaltiere)	—	27	356	12	3,4		344	0

Tab. 1. Prüfung der embryotoxischen Wirkung von *N*-Phthalyl-DL-isoglutamin und DL-Isoglutamin. ^a 1- bzw. ^b 4-proz. Lösung in einer Mischung aus physiologischer Kochsalzlösung und Tween 20 (3 : 1). Alle Verabreichungen erfolgten intraperitoneal 9 Tage 0 Stdn. p. c.

ten (vornehmlich Radius- und Tibia-Aplasien). Mißbildungen in der Kopfregeion werden nicht beobachtet.

DL-Isoglutamin dagegen zeigt selbst bei Applikation von 400 mg/kg keine embryotoxische Wirkung. Diese Dosis führt weder zu Mißbildungen noch zu einer Erhöhung der Resorptionen (Gruppe II). Nach 800 mg/kg ist zwar die Resorptionsrate auf 15,4% angestiegen, jedoch finden sich auch hier keine mißgebildeten Feten.

Diese Ergebnisse bestätigen die bisherige Erfahrung: Isoglutamin ruft unter den angegebenen Versuchsbedin-

gungen ebenso wie Glutaminsäure¹² und Glutamin⁹ keine Fruchtschädigungen hervor, während die Phthalyl-Derivate dieser Aminosäuren zu Anomalien im Skelettsystem unter gleichzeitiger Erhöhung der Resorptionsrate führen. Die drei Hydrolysenprodukte des Thalidomids mit intakter Phthalimid-Struktur besitzen somit ausnahmslos teratogene Aktivität.

¹² F. KÖHLER, W. MEISE u. H. OCKENFELS, *Experientia* [Basel] 1971, im Druck.

Haemagglutinine aus Schnecken: Zur Frage ihrer biologischen Funktion

Haemagglutinins in Snails. A Discussion of their
Biological Function

HANS KOTHBAUER und HELMUT SCHENKEL-BRUNNER

Erstes Zoologisches Institut und Institut für Biochemie
der Universität Wien

(Z. Naturforsch. 26 b, 1082—1084 [1971]; eingegangen am 19. Juli 1971)

Die 1965 von PROKOP und Mitarb. entdeckten Haemagglutinine aus den Eiweißdrüsen von *Helix* (= *Cepaea*) *hortensis* und *Helix pomatia* (BOYD und BROWN beschrieben unabhängig davon ein Agglutinin aus *Otala lactea*; Übersicht^{1,2}), gaben den Anstoß zu zahlreichen weiteren Untersuchungen über Vorkom-

men und Wirkungsweise von Schneckenagglutininen (Übersicht³).

Schneckenagglutinine wurden vor allem in den Eiweißdrüsen verschiedener Landlungschnecken³, den Eiern von *Helix aspersa*⁴, und *Helix pomatia*⁵ gefunden, oder die Agglutinine wurden aus ganzen Tieren gewonnen, z. B. ^{3,6-9}. Das Agglutinin aus *Helix pomatia* ist an den Genitalapparat und dessen Funktion gebunden⁵.

Die biologische Funktion der vor allem aus dem Genitalapparat von Schnecken (und auch aus Fisch-eiern) gewonnenen Agglutinine sehen PROKOP, UHLENBRUCK und KÖHLER in einer immunbiologischen Schutzfunktion für die Eier und nannten diese Gruppe antikörperähnlicher Verbindungen Protectine^{10,11}, vgl. l. c.³.

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. KOTHBAUER, I. Zoologisches Institut der Universität Wien, A-1010 Wien I., Dr. Karl Lueger-Ring 1, Österreich.

¹ O. PROKOP, G. UHLENBRUCK u. W. KÖHLER, *Vox Sang.* 14, 321 [1968].

² O. PROKOP u. G. UHLENBRUCK, *Protectine*, in: Fortschritte der Hämatologie, Bd. 1, Joh. Ambros. Barth, Leipzig 1970.

³ S. SCHNITZLER u. R. KILIAS, *Blut* 20, 221 [1970].

⁴ E. R. GOLD u. T. E. THOMPSON, *Vox Sang.* 16, 63 [1969].

⁵ H. KOTHBAUER, *Oecologia* [Berlin] 6, 48 [1970].

⁶ W. C. BOYD, R. BROWN u. L. G. BOYD, *J. Immunology* 96, 301 [1966].

⁷ M. KRÜPE u. H. PIEPER, *Z. Immunforsch.* 130, 296 [1966].

⁸ R. BROWN, L. R. ALDOMOVAR, H. M. BHATIA u. W. C. BOYD, *J. Immunology* 100, 214 [1968].

⁹ R. T. PEMBERTON, *Vox Sang.* 16, 503 [1969].

¹⁰ O. PROKOP, G. UHLENBRUCK u. W. KÖHLER, *Dtsch. Gesundheitswes.* 23, 318 [1968].

¹¹ O. PROKOP, *Folia haematol.* [Leipzig] 92, 266 [1969].

Bei den untersuchten Schnecken handelte es sich meist um Pulmonaten (Lungenschnecken), die Zwitter sind. Prosobranchia (Vorderkiemerschnecken), die meist getrenntgeschlechtlich sind, wurden nur verhältnismäßig selten getestet. Die untersuchten Prosobranchia wurden nicht nach Geschlechtern getrennt, z. B. l. c. ^{6, 8, 9}. Nur in einem uns bekannten Fall wurden männliche und weibliche Tiere getrennt, aber nur die Weibchen untersucht ¹². Soweit uns bekannt, wurden noch keine Männchen getestet.

Die von uns untersuchten Prosobranchia wurden nach Geschlechtern getrennt und Weibchen und Männchen untersucht.

Wenn es sich bei allen aus Schnecken gewonnenen Agglutininen nur um Protectine (im Sinne von Eischutzstoffen) handelte, müßten sie nur in weiblichen Tieren und nicht in männlichen Tieren aufzufinden sein.

Material und Methoden

Die untersuchten Arten sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Art	Geschlecht	Anzahl	Schalenhöhe [mm] max. — min.
<i>Ampullarius</i> sp.*	♂	6	46,0 — 31,0
	♀	7	44,0 — 23,0
<i>Murex trunculus</i> L.	♂	5	63,0 — 55,0
	♀	8	70,0 — 50,0
<i>Murex brandaris</i> L.	♂	5	93,0 — 55,0
	♀	4	70,0 — 55,0
<i>Pomatias elegans</i> (Müll.)	♂	11	16,0 — 12,0
	♀	9	16,0 — 13,0
<i>Melanoides tuberculatus</i> (Müll.)	♀	33	20,0 — 15,0
<i>Viviparus viviparus</i> (L.)	♂	12	42,5 — 37,5
	♀	12	48,0 — 39,5
<i>Viviparus contextus</i> (Millet)	♂	7	35,0 — 23,0
	♀	17	45,0 — 21,0
<i>Bithynia tentaculata</i> (L.)	♂	18	9,5 — 8,0
	♀	11	10,0 — 8,0
<i>Lithoglyphus naticoides</i> (C. Pfr.)	♂	8	9,0 — 6,0
	♀	34	9,5 — 6,0
<i>Valvata piscinalis</i> (Müll.)	Zwitter	36	5,5 — 3,5

Tab. 1. Untersuchte Schneckenarten — Geschlecht, Anzahl und Größe. * Bei den Ampullarien — verhältnismäßig häufig in Wiener Warmwasseraquarien zu finden — handelt es sich möglicherweise um *Ampullarius australis* d'Orbigny. Die Tiere konnten nicht eindeutig bestimmt werden.

Herkunft der Tiere

Ampullarius sp. und *Melanoides tuberculatus* stammen aus verschiedenen Warmwasseraquarien. *Murex trunculus* und *M. brandaris* wurden in einer Tierhaltung erworben — ursprünglich kamen die Tiere aus

der nördlichen Adria. *Pomatias elegans* stammte aus der Tierhaltung des Instituts — ursprünglich kamen sie aus Istrien.

Die anderen 5 Arten wurden im Mai 1971 in der Umgebung Wiens gesammelt: *Viviparus contextus* in einem Autümpel bei Albern und in der Lobau (Lobau-Brücke), *V. viviparus* im Überschwemmungsgebiet der Donau (Zinkerbachl), *Lithoglyphus naticoides*, *Bithynia tentaculata* und *Valvata piscinalis* in der Kuchelau.

Trennung der Tiere nach Geschlechtern

Von *Melanoides tuberculatus* wurden bis jetzt nur Weibchen gefunden; sie pflanzen sich parthenogenetisch fort. *Valvata piscinalis* ist ein Zwitter. Den anderen untersuchten Schnecken wurden die Schalen aufgeschlagen und die Mantelhöhlen dorsomedian eröffnet. Die Männchen hatten einen deutlichen Penis bzw. bei *Viviparus*-Männchen einen dicken rechten Tentakel.

Herstellung der Extrakte

Die Proben wurden tiefgefroren und lyophilisiert. Die Gattungen *Murex*, *Ampullarius* und *Viviparus* wurden von ihren Schalen befreit. Die getrockneten Schnecken wurden sodann in einer Reibschale möglichst fein pulverisiert, weitere 12 Std. in einem Vakuumexsiccator getrocknet und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Die Proben wurden über Nacht in folgendem Puffer (Puffer A) bei 4°C extrahiert: 100 ml physiol. NaCl, 24 ml 0,15 M KH_2PO_4 und 76 ml 0,15 M Na_2HPO_4 (4 ml Puffer/g Trockensubstanz).

Die Gelege von *Bithynia tentaculata* wurden in frischem Zustand mit Hilfe eines Potter-Elvehjem Homogenisators homogenisiert (0,1 ml Puffer A/50 mg Gelege).

Nach Zentrifugation der Extrakte (30 min bei 38 000 g) wurde die Agglutinationsfähigkeit gegen Erythrocyten ausgetestet. Verwendet wurden normale und ficinbehandelte A₁, B und 0 Erythrocyten. Ficinbehandlung s. l. c. ¹³.

Haemagglutinationstest

Von den Extrakten wurden geometrische Verdünnungsreihen (1 : 2ⁿ) in Nöpfchen von Salkplatten hergestellt. Zu jeder Extraktverdünnung wurde sodann die selbe Menge 2% Erythrocytensuspension zugesetzt. Nach 2 Std. Inkubation bei Zimmertemperatur wurde der Titer bestimmt. Als Titer wird die Verdünnung des Extraktes angegeben, die gerade noch eine merkliche Agglutination verursachte.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 2 wiedergegeben.

¹² I. POPWASSILEW, A. RACKWITZ u. O. PROKOP, Z. Immunforsch. **139**, 372 [1970].

¹³ D. M. MARCUS u. A. P. GROLLMAN, J. Immunology **97**, 867 [1966].

Art	Geschlecht bzw. Gelege	Titer gegen Erythrocyten					
		A ₁	A _{1F} *	B	B _F *	0	0 _F *
1. <i>Ampullarius</i> sp.	♂ + Gelege	4 >1024 >1024	8 >1024 >1024	4 >1024 >1024	16 >1024 >1024	2 512 >1024	8 >1024 >1024
2. <i>Murex trunculus</i>	♂ + Gelege	— 2 —	4 4 —	2 2 —	2 2 —	— 2 —	— 2 —
3. <i>Murex brandaris</i>	♂ + Gelege	2 2 —	16 4 —	2 2 —	4 2 —	2 2 —	4 2 —
4. <i>Pomatias elegans</i>	♂ + Gelege	— — —	4 8 —	— — —	2 2 —	— — —	— — —
5. <i>Melanoides tuberculatus</i>	♂ + Gelege	— — —	2 2 —	— — —	— — —	— — —	— — —
6. <i>Viviparus viviparus</i>	♂ + Gelege	> 16 — —	> 16 2 —	2 — —	16 — —	2 — —	> 16 — —
7. <i>Viviparus contectus</i>	♂ + Gelege	2 — —	2 — —	— — —	— — —	— — —	— — —
8. <i>Bithynia tentaculata</i>	♂ + Gelege	— 2 —	16 > 16 —	— — —	— 2 —	— — —	— 4 —
9. <i>Lithoglyphus naticoides</i>	♂ + Gelege	2 — —	16 2 —	— — —	2 — —	— — —	— — —
10. <i>Valvata piscinalis</i>	Zwitter	—	—	—	—	—	—

Tab. 2. Untersuchte Schneckenarten — Titer gegen Erythrocyten. * F = Ficinbehandelt.

Agglutination trat auf:

- Bei beiden Geschlechtern: bei Männchen und Weibchen ca. gleich stark (Tab. 2: 2, 4), bei Weibchen stärker als bei Männchen (Tab. 2: 1, 8), bei Männchen stärker als bei Weibchen (Tab. 2: 3), hauptsächlich bei Männchen und nur sehr schwach bei Weibchen (Tab. 2: 6, 9).
- Bei den Tierkörpern und den entsprechenden Gelegen (Tab. 2: 1).
- Bei den Tierkörpern und nicht bei den entsprechenden Gelegen (Tab. 2: 8, 9).

Bei manchen untersuchten Arten bzw. Geschlechtern, trat keine, oder nur sehr schwache Agglutination auf (Tab. 2: 5, 6, 7, 9, 10).

Diese Ergebnisse ermöglichen folgende Rückschlüsse:

- Es ist nicht möglich, alle aus Schnecken gewonnenen Agglutinine nur als Protectine (im Sinne von Eischutzstoffen) zu verstehen. Agglutinine können in beiden Geschlechtern auftreten (z. B. Tab. 2: 1, 3, 6, 8, 9). Sie können auch nur in den Tierkörpern und nicht in den dazugehörigen Gelegen zu finden sein (Tab. 2: 8, 9). Es ist denkbar, daß es sich bei den Schneckenagglutininen um vorhandene Stoffe verschiedenster biologischer Funktion handelt, von denen einige, bei manchen Arten „vermehrt“, durchaus als Schutzstoffe (auch für Eier) wirken können (z. B. Tab. 2: 1). Die Forderung, daß Tiere, die ihre Eier ablegen, einen „Schutzmechanismus“ für ihre Eier haben

müssen, ist naheliegend. Dieser Schutz der Eier kann ein Schutzstoff (Agglutinin oder anderer Art) sein. Die Erhaltung der Art kann aber durchaus auch durch große Eizahlen, durch Ablegen mehrerer Gelege an „günstigen Orten“ etc. gewährleistet werden (*Lithoglyphus*-Gelege werden z. B. meist an die Schalen von Artgenossen „geklebt“). Das Vorhandensein eines Schutzstoffes für Eier ist daher nicht unbedingte Voraussetzung. Bei verhältnismäßig geringer Nachkommenzahl könnte ein mögliches Fehlen eines entsprechenden Schutzstoffes mit ein Grund für Viviparie sein (z. B. Tab. 2: 5, 6, 7; diese Tiere sind vivipar).

Alle in Schnecken gefundenen Agglutinine sind sicher nicht nur von einem Gesichtspunkt aus zu deuten (vgl. z. B. Tab. 2: 1, 6, 8, 9).

- Bei manchen Arten dürfte es Agglutinine geben, die an das Geschlecht „gebunden“ sind (z. B. Männchen Tab. 2: 6).
- Der Agglutiningehalt von Tieren verschiedener Arten ist nicht biotopabhängig (Tab. 2: 8, 9 u. 10; diese Tiere wurden zur selben Zeit im selben Biotop gesammelt).

Die Arbeit wurde durch Gewährung eines Wissenschaftsstipendiums der Stadt Wien (MA 7) an H. KOTHBAUER ermöglicht. Herrn Prof. Dr. H. TUPPY, Vorstand des Instituts für Biochemie der Universität Wien, danken wir für die kritische Durchsicht des Manuskriptes, Frau Dr. JANCEK (Immuno AG) für die Bereitstellung der Erythrocyten.

Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1. *Schistocerca gregaria* Forsk. Imago. Frontalschnitt durch das Ganglion frontale. a = Autofluoreszenz, Gf = Ganglion frontal, Nl = Neurilemma, Np = grün fluoreszierendes Neuropil, Z₁ = median, Z₂ = peripher getroffener gelb fluoreszierender Zellkörper. Der gelbe Fluorophor der anderen Zellkörper ist verblaßt (→). Tr = Trachea.

Abb. 2. *Schistocerca gregaria* Forsk. Imago. Frontalschnitt durch das Ganglion occipitale. Go = Ganglion occipitale, Z = grün fluoreszierende Zellkörper. Weitere Abkürzungen s. Abb. 1.