

112. Fritz Micheel und Heinrich Schmitz: Zur Kenntnis der Schlangengifte (IV. Mittel.).

[Aus der organ. Abteil. d. Chem. Instituts d. Universität Münster i. W.]
(Eingegangen am 22. Februar 1938.)

In früheren Mitteilungen¹⁾ wurde gezeigt, daß die Neurotoxine der von uns untersuchten Colubridengifte (*Naja flava*, *Naja tripudians*) eine schwefelhaltige Gruppe tragen, die für ihre Wirksamkeit von entscheidender Bedeutung ist. Über die mögliche Bindungsart des Schwefels wurde eine Arbeitshypothese aufgestellt, dahingehend, „daß der Schwefel wahrscheinlich nicht als Disulfid-Schwefel, sondern eher thio-lacton-artig gebunden vorliegt“. Diese Möglichkeit wurde weiter dahingehend eingeschränkt, daß auch „eine andersartige Atomanordnung nicht ausgeschlossen ist“. Dabei wurde eine thiazolidin-artige Struktur diskutiert. Das Vorliegen einer Disulfid-Bindung wurde für wenig wahrscheinlich gehalten, weil die Neurotoxine der genannten *Naja*-Arten gegen Reduktion mit Cystein oder Glutathion in den von uns untersuchten Konzentrationen beständig sind, während z. B. das Insulin²⁾ durch diese Thiole in ähnlicher Konzentration in etwa 12 Stdn. inaktiviert wird. Für das Insulin ist eine Cysteinbindung gesichert. In einer kürzlich erschienenen Mitteilung berichten Slotta und Fraenkel-Conrat³⁾, daß die nativen Gifte zweier Viperiden, *Crotalus terrificus* und *Bothrops jararaca*, durch Einwirkung großer Überschüsse von Cystein (bis zum 40-fachen der angewandten Giftmengen) weitgehend inaktiviert werden können. Slotta glaubt diese Befunde ohne weiteres auf die von uns untersuchten Neurotoxine von Colubriden übertragen zu dürfen, ohne dies experimentell zu belegen⁴⁾. Er hält durch seine Versuche für „eindeutig bewiesen, daß in verschiedenen Neurotoxinen normale -S-S-Brücken vorliegen, die für die Wirksamkeit der Gifte von entscheidender Bedeutung sind“ und meint damit schlechthin alle Neurotoxine in den Giften der verschiedenen Schlangenarten. Ohne uns im einzelnen mit den von Slotta a. a. O. eingehend vorgetragenen Anschauungen schon jetzt auseinanderzusetzen, teilen wir folgendes mit:

Unsere frühere Feststellung, daß die hochgereinigten Neurotoxine aus *Cobra*-Giften durch Cystein, sofern dies nicht in ungewöhnlich hohen Konzentrationen angewandt wird, nicht mit merklicher Geschwindigkeit geschwächt werden, muß erweitert werden: bei Einwirkung sehr großer Überschüsse an Cystein (40- bis 80-fache Gewichtsmenge)⁵⁾ auf gereinigtes Neurotoxin⁶⁾ (ultrafiltriert und dialysiert) tritt in kurzer Zeit eine kleine Abnahme der Wirksamkeit ein (bis zu etwa 25%), die irreversibel ist. Die Reaktion

¹⁾ II. Mittel.: Ztschr. physiol. Chem. **239**, 217 [1936]; III. Mittel.: Ztschr. physiol. Chem. **249**, 157 [1937].

²⁾ du Vigneaud, Fitch, Pekarek u. Lockwood, Journ. biol. Chem. **94**, 233 [1931]; Wintersteiner, J. biol. Chem. **102**, 473 [1933]. ³⁾ B. **71**, 264 [1938].

⁴⁾ Lediglich folgendes wird (l. c., S. 266) von Slotta mitgeteilt: „Das sehr alte *Naja-tripudians*-Giftpräparat, das wir hatten, besaß nur etwa 15% der von anderen ermittelten Aktivität, und wir wollen die bisher nicht eindeutigen Versuche lieber mit frischem Gift später wiederholen.“

⁵⁾ Diese Überschüsse sind zahlenmäßig noch bedeutend größer, wenn auf Schwefelatome umgerechnet wird.

⁶⁾ Dies Produkt stellt noch nicht das hochgereinigte Neurotoxin vor, wie wir es früher verwendeten.

ist bei den angewandten Cysteinüberschüssen⁷⁾ innerhalb etwa einer Stunde beendet; beim längeren Stehenlassen oder bei erneuter Zugabe von Cystein tritt keine weitere Abnahme der Giftigkeit ein. Der Tod der Versuchstiere erfolgt nach wie vor durch Atemlähmung. Daraus ist zu schließen: das lediglich durch Ultrafiltration und Dialyse gereinigte Neurotoxin enthält noch etwa 25% einer Komponente von noch nicht näher definierter physiologischer Wirksamkeit, die durch Cystein inaktiviert wird. Das Neurotoxin der Atemlähmung selbst ist gegen Reduktion mit Cystein beständig. Auch durch elektrolytische Reduktion wird es, wie andere Versuche zeigten, nicht verändert.

Die Ausführungen von Slotta über die Struktur der schwefelhaltigen Gruppe unserer atemungslähmenden Neurotoxine aus Cobra-Giften sind damit hinfällig. Daß bei den nativen Viperiden-Giften, wie Slotta fand, eine weitgehende Inaktivierung mit Cystein zu erzielen ist, konnte Hr. Dr. Bode am Gifte von *Crotalus terrificus* bestätigen. Die Gifte der beiden Arten von Giftschlangen, der Colubriden und der Viperiden, sind jedoch hinsichtlich ihres physikalischen, chemischen und physiologischen Verhaltens so weitgehend verschieden, daß dies keineswegs überrascht. Während nach den Angaben der umfangreichen Literatur das Colubriden-Gift, insbesondere das der Naja-Arten, den Tod im wesentlichen durch Lähmung der Atmung herbeiführt und andere Neurotoxine, ferner Hämolyse und Hämorrhagie dabei zurücktreten, wird bei den Viperiden-Giften der Tod überwiegend durch Kreislaufstörungen und eine starke Hämolyse hervorgerufen. Vermutlich wird also in den von Slotta untersuchten Viperiden-Giften eine maßgebende Komponente durch Cystein inaktiviert, die in den genannten Colubriden-Giften nur in geringen Mengen vorhanden ist.

Daß es sich ferner nicht um ein Gleichgewicht zwischen Cystein und der schwefelhaltigen Gruppe im Gift handelt, das durch Zugabe großer Cysteinmengen verschoben wird, wie Slotta meint, geht daraus hervor, daß der Gesamtvorgang nicht reversibel ist. Die aus der Giftkomponente mit Cystein gebildete SH-Komponente erleidet anscheinend eine sekundäre, irreversible Umwandlung und wird so dem möglicherweise vorhandenen primären Gleichgewicht entzogen. (Ein ähnliches Verhalten zeigt das Insulin bei der Reduktion mit Cystein.) Je größer die Cystein-Mengen, um so größer wird lediglich die Inaktivierungsgeschwindigkeit. Der günstige Einfluß wachsender Mengen Cystein auf den Grad der Inaktivierung, wie er von Slotta berichtet wird, bedarf noch eingehender Untersuchung, da er wohl z. Tl. auf die Unsicherheit der Versuchsmethodik zurückzuführen ist. Durch Verminderung der Thiol-Konzentration in inaktivierten Lösungen (vorsichtige Behandlung mit Sauerstoff) tritt keine Reaktivierung ein.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß unsere Arbeitshypothese über die Bindungsart des Schwefels in dem die Atmung lähmenden Neurotoxine durch die Ausführungen von Slotta keineswegs beeinflußt wird. Wir betonen nochmals, daß es sich bei unseren Auffassungen lediglich um eine Arbeitshypothese handelt; nach neueren Untersuchungen, die demnächst veröffentlicht werden, ist keine der früher angegebenen Formulierungen über die Bindungsart des Schwefels restlos befriedigend, am wenigsten jedoch die als -S-S-Gruppe. Wir möchten uns deshalb einer theoretischen Deutung der Ergebnisse von Slotta, die Inaktivierung von Viperiden-Gift durch

⁷⁾ In besonderen Versuchen wurde festgestellt, daß die Tiere die angegebenen und weit höheren Cysteinmengen ohne weiteres vertragen (im Gegensatz z. B. zum Alanin).

Cystein betreffend, enthalten, solange wir keine weiterreichenden eigenen Erfahrungen am Viperidengift gesammelt haben. Wir würden eine gleiche Zurückhaltung von Seiten von Slotta und Mitarbeitern mit Bezug auf unsere Befunde an Colubriden-Giften begrüßen.

Für die Untersuchungen standen uns Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Firma C. F. Boehringer-Mannheim zur Verfügung. Wir danken den Genannten für ihre Hilfe bestens.

Beschreibung der Versuche.

Die in den folgenden Tafeln gebrachten Ergebnisse stellen Mittelwerte aus einer größeren Zahl von Versuchsreihen vor. Es wurde bei den Einzelversuchen folgendermaßen verfahren:

500 γ Neurotoxin⁸⁾ (ultrafiltriert und dialysiert) der *Naja tripudians* wurden mit 200 mg Cystein-hydrochlorid⁹⁾ und 6.75 mg Na₂CO₃ in 5 ccm sauerstoff-freiem Wasser unter Stickstoff gelöst. Mit 5 ccm Phosphatpuffer wurde auf p_H 7.5 gebracht und die Wirksamkeit der Lösung nach den in Tafel 1 angegebenen Zeiten bei mindestens 3 Mäusen geprüft. Ebenso wurde mit dem 80-fachen Überschuß an Cystein-hydrochlorid verfahren. Während der ganzen Versuchsdauer wurde die Lösung unter sauerstoff-freiem Stickstoff gehalten. Die Wirksamkeit des Neurotoxins in dem gleichen Puffer, aber ohne Cystein, geprüft, betrug 1 ME = 0.29 γ . Dieser Wert wurde gleich 100% gesetzt.

Tafel 1.

Gift	Überschuß an Cystein-HCl	Wirksamkeit nach									
		15 Min.		45 Min.		60 Min.		3 Stdn.		24 Stdn.	
		1ME in γ	%								
<i>Naja tripudians</i>	40-fach	0.34	86	0.39	75	0.39	75	0.39	75	0.34	86
<i>Naja tripudians</i>	80-fach	0.34	86	0.39	75	0.41	71	0.41	71	0.35	83

Eine Lösung, die einen 40-fachen Überschuß an Cystein-hydrochlorid enthielt, wurde wie oben im Testversuch ausgewertet und nach 24 Stdn. in 2 Teile geteilt. Teil a wurde bis zum Verschwinden der SH-Reaktion mit O₂ oxydiert, das ausgeschiedene Cystin abzentrifugiert und die Lösung nach insgesamt 25 und 27 Stdn. geprüft. Zum Teil b wurden nochmals 20 mg frisches Cystein-hydrochlorid zugegeben und nach insgesamt 27 Stdn. geprüft. Bei beiden Lösungen trat keine Veränderung der Wirksamkeit ein (Tafel 2).

Tafel 2.

	Wirksamkeit nach			
	25 Stdn.		27 Stdn.	
	1ME in γ	%	1ME in γ	%
Teil a	0.38	76	0.38	76
Teil b	—	—	0.38	76

⁸⁾ Das Neurotoxin ist nicht weiter gereinigt worden und enthielt die früher beschriebenen Komponenten A und C.

⁹⁾ Präparat Hoffmann-La Roche mit einem Gehalt von 93% (titriert nach Wintersteiner, Journ. biol. Chem. 102, 475 [1933]).