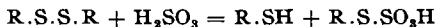


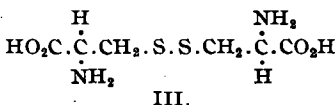
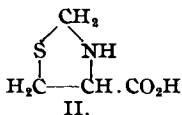
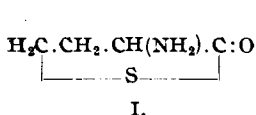
**437. Fritz Micheel und Gustav Bode:
Zur Kenntnis der Schlangengifte (VIII. Mitteil. *).**

[Aus d. Organ. Abteil. d. Chem. Instituts d. Universität Münster i. W.]
(Eingegangen am 9. November 1938.)

Vor einiger Zeit wurde über den quantitativen Vergleich der bei der Sulfid-Inaktivierung des Neurotoxins aus Cobragift auftretenden Sulfhydrylgruppen in einer kurzen Originalmitteilung¹⁾ berichtet. Die ausführliche Darstellung der Versuchsergebnisse war im Rahmen einer zusammenhängenden Arbeit beabsichtigt, mußte aber infolge mehrmonatiger Unterbrechung der betreffenden Arbeiten bisher unterbleiben. Sie sei jetzt gegeben. Wie früher gezeigt wurde²⁾, wird das Neurotoxin aus Cobragift durch Sulfid schon in geringen Konzentrationen ziemlich rasch inaktiviert. Parallel zur Inaktivierung geht eine beträchtliche Verschiebung der optischen Drehung in negativer Richtung. Da bei der Einwirkung von Sulfid auf Cystin und analoge Stoffe diese im Sinne folgender Gleichung gespalten werden³⁾, so konnte



das Auftreten oder Nichtauftreten von SH-Gruppen bei der Inaktivierung als ein Zeichen für das Vorliegen oder Nichtvorliegen einer S-S-Bindung in der prosthetischen Gruppe des Neurotoxins aus Cobragift gelten. Aber auch andere schwefelhaltige Aminosäure-Derivate zeigen bei der Behandlung mit Sulfid die Bildung von SH-Gruppen: positiver Befund ergab sich beim Homo-cystein-lacton (I) und einer Thiazolidin-carbonsäure (II). Wir waren in unserer vorläufigen Mitteilung¹⁾ zu dem Schluß gekommen, daß das Cobra-Neurotoxin in seiner prosthetischen Gruppe wegen seines Verhaltens bei der Sulfid-Einwirkung keine Atomanordnung von der Art der genannten schwefelhaltigen Verbindungen enthalten könne. Besonders wichtig für diese Erkenntnis waren Feststellungen, die sich aus dem Verhalten des Neurotoxins und der Modellssubstanzen I, II und III gegenüber Sulfid bei verschiedenem p_H ergaben.



Die Inaktivierungsgeschwindigkeit des Neurotoxins mit Sulfid ist stark von der Wasserstoffionen-Konzentration abhängig. Sie ist unter sonst gleichen Bedingungen bei p_H 6.6 verhältnismäßig klein und steigt bei stärker saurer Reaktion (p_H 5.2 und 4.0) sehr bedeutend an⁴⁾ (Abbild. 1). Bemerkenswert sei, daß bei den genannten Wasserstoffionen-Konzentrationen das Neurotoxin ohne Sulfid über Wochen beständig ist. Vergleicht man jetzt die bei ver-

* VII. Mitteil.: B. 71, 1446 [1938].

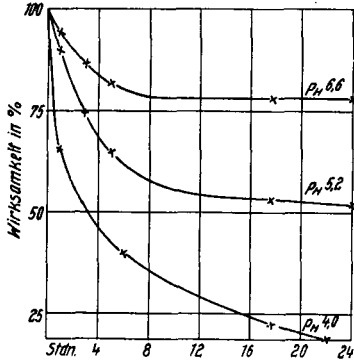
¹⁾ Micheel u. Bode, Naturwiss. 26, 298 [1938].

²⁾ Micheel, Dietrich u. Bischoff, Ztschr. physiol. Chem. 249, 157 [1937].

³⁾ Clarke, Journ. biol. Chem. 97, 235 [1932].

⁴⁾ Natriumacetat-Puffer bei p_H 4.0 u. 5.2, Phosphat-Puffer bei p_H 6.6. Bei ungünstigem Einfluß des Phosphatpuffers, wie er kürzlich von Schöberl (B. 71, 2365 [1938]) für die Reduzierbarkeit von Phosphorwolframsäure durch gewisse SH-Verbindungen beobachtet wurde, würden die bei p_H 6.6 gefundenen Werte zu niedrig sein. Wie man aus den Kurven sieht, wäre dies ohne Einfluß auf die Schlußfolgerungen.

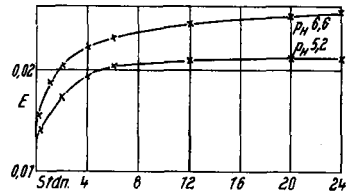
schiedenem p_H (6.6, 5.2 und 4.0) auftretenden Mengen an Thiol nach der Methode von Folin-Marenzi⁵⁾, so zeigt sich, daß die Mengen der gebildeten SH-Gruppen mit kleiner werdendem p_H stark abnehmen (Abbild. 2). Wie schon in der früheren Arbeit berichtet¹⁾, wurden die Messungen des Reduktionsvermögens gegenüber Phosphorwolframsäure alle beim gleichen p_H von 5.2 (Acetatpuffer) ausgeführt⁶⁾, weil es sich gezeigt hatte, daß das Reduktionsvermögen von Thiolverbindungen gegenüber Phosphorwolframsäure mit abnehmendem p_H geringer wird. Die gleiche Beobachtung wurde inzwischen von Schöberl gemacht und näher untersucht⁷⁾. Die optischen Messungen des bei p_H 4 gespaltenen Neurotoxins haben jedoch nur qualitative Bedeutung, da die Lösung nach Zugabe der Phosphorwolframsäure eine leichte Trübung zeigt.



Abbild. 1. Inaktivierungsgeschwindigkeit von Neurotoxin durch Sulfid.

Konzentration Neurotoxin 0.14%
 „ Sulfid 0.14%.

4.0) untersucht. Auch hier zeigte sich, daß die Spaltungsgeschwindigkeit mit sinkendem p_H -Wert abnimmt (Abbild. 3). Da die Messungen sämtlich beim p_H 5.2 erfolgten, so sind die für jedes einzelne Präparat gefundenen Werte unter sich vergleichbar und zeigen eindeutig an, daß jeder der untersuchten Stoffe mit abnehmendem p_H langsamer Thiol bildet. (Ein Vergleich der Stoffe miteinander hinsichtlich der gebildeten Thiol-Menge darf jedoch nicht erfolgen⁸⁾, ist auch für die zu ziehenden Schlußfolgerungen ohne Belang.) Das Neurotoxin und die untersuchten S-Verbindungen verhalten sich also ganz analog. Da nun umgekehrt, wie oben gezeigt, das Neurotoxin bei sinkendem p_H immer schneller an Wirksamkeit verliert, so ergibt sich, daß die Inaktivierung und die Bildung von SH-Gruppen sehr wahrscheinlich nichts miteinander zu tun haben. Der Angriff des Sulfids in der prosthetischen Gruppe führt nicht zur Bildung von Thiolgruppen; es kann somit für die Wirkungsgruppe des Neurotoxins aus Cobragift keiner der oben genannten Bausteine (I, II und III) oder deren Analoge in Frage kommen, da diese ja mit abnehmendem p_H immer langsamer gespalten werden. Das Sulfid muß bei der Inaktivierung an einer andersartigen Atomgruppierung angreifen,



Abbild. 2. Spaltungsgeschwindigkeit von Neurotoxin in Abhängigkeit vom p_H -Wert.

S-Konzentration $1 \times 10^{-4}\%$.

⁵⁾ Journ. biol. Chem. 83, 103 [1929].

⁶⁾ Die Spaltungsansätze wurden nach erfolgter Spaltung in viel Acetatpuffer (p_H 5.2) gebracht (s. Versuchsteil).

⁷⁾ Schöberl u. Krumej, B. 71, 2362 [1938].

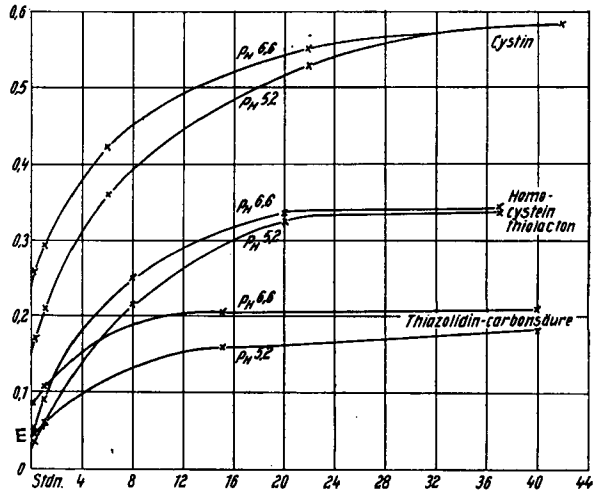
⁸⁾ vergl. dazu die Untersuchungen von Schöberl u. Krumej, l. c.

die ohne Bildung von SH-Gruppen gespalten wird, und zwar bei abnehmendem p_H mit zunehmender Geschwindigkeit.

Das von uns untersuchte, durch Ultrafiltration und Dialyse gereinigte Neurotoxin enthält jedoch, wie die Versuche zeigen, zweifellos Atomgruppierungen, die mit Sulfid Thiolgruppen bilden. Ob diese einer Verunreinigung oder einem nicht zur prosthetischen Gruppe gehörenden Teil des Moleküls angehören, oder ob sie der Begleitkomponente entstammen, die, wie die Reduzierbarkeit mit Cystein zeigt⁹⁾, in geringem Maße dem natürlichen Cobragift beigelegt ist, läßt sich nicht entscheiden. Was die Struktur der durch Sulfid aufspaltbaren prosthetischen Gruppe des Neurotoxins selbst betrifft, so ist anzunehmen, daß die weiter in Gang befindlichen Untersuchungen des vor kurzem beschriebenen¹⁰⁾ kristallisierten Abbauproduktes aus der Sulfidspaltung darüber Auskunft geben werden. Bisher läßt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob das Sulfid bei der Spaltung überhaupt an einem Schwefelatom angreift.

In diesem Zusammenhange mag auf folgendes hingewiesen werden: Man pflegt die

schwefelhaltigen Bausteine von Eiweißstoffen nach völliger Hydrolyse des betreffenden Materials zu bestimmen, z. B. beim Insulin¹¹⁾, bei der Eiweißkomponente des gelben Ferments¹²⁾ oder bei Schlangengiften¹³⁾. Je nach der Art der Hydrolyse erhält man im Hydrolysat Cystin und Methionin oder mit Jodwasserstoff nach Bärnstein¹⁴⁾ Cystein und Homocysteinlacton, die nach verschiedenen Methoden colorimetrisch bestimmt werden. Vielfach hat man aus diesen Bestimmungen geschlossen¹¹⁾¹³⁾, daß das gefundene Cystin bzw. Cystein in dem untersuchten Eiweiß restlos als Cystin (.S.S.) gebunden vorliegt, und daraus recht weittragende Folgerungen gezogen¹³⁾, die im Falle des Cobra-Neurotoxins mit anderen Befunden nicht in Einklang zu bringen waren. Dabei wurde übersehen, daß im total hydrolysierten Eiweiß bestimmtes Cystin bzw. Cystein noch nichts darüber aus-



Abbild. 3. Spaltungsgeschwindigkeit von Modellschubstanzen in Abhängigkeit vom p_H -Wert. S-Konzentration 1×10^{-3} o/o.

⁹⁾ Micheel u. Schmitz, B. **71**, 703, 1446 [1938].

¹⁰⁾ Micheel u. Bode, B. **71**, 1302 [1938].

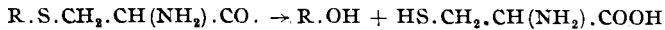
¹¹⁾ Miller u. Du Vigneaud, Journ. biol. Chem. **118**, 101 [1937].

¹²⁾ Kuhn u. Desnuelle, B. **70**, 1907 [1937].

¹³⁾ Slotta u. Mitarbb. B. **71**, 1082, 1623 [1938].

¹⁴⁾ Journ. biol. Chem. **106**, 453 [1934].

sagt, ob in dem in Frage stehenden Ausgangsmaterial wirklich aller Schwefel in S-S-Bindungen vorlag. Auch Atomgruppierungen, die eine im folgenden Sinne hydrolysierbare Bindung enthalten¹⁵⁾:



würden bei der üblichen Art der Hydrolyse (ohne Vermeidung von Dehydrierung) Cystin bilden¹⁶⁾ bzw. bei Hydrolyse mit Jodwasserstoff zu Cystein führen. Letzten Endes sagen also Bilanzversuche (Vergleich der Schwefel-(elementar)-analyse an nativen Stoffen mit der Cystin- bzw. Cystein- und Methionin-Bestimmung im Hydrolysat) noch nichts Eindeutiges über die Bindung des Schwefels im nativen Eiweiß. Erst Untersuchungen an diesem selbst (Spaltbarkeit mit Cystein oder mit Sulfit) können weitere Auskunft geben. Dies ist insbesondere bei der Schwefelbilanz in den angeführten Arbeiten¹³⁾ über die Bindung des Schwefels in Schlangengiften zu berücksichtigen. Wir werden darauf später zurückkommen.

Für die Unterstützung dieser Arbeit sind wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Firma C. F. Boehringer & Söhne zu großem Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche.

Als Puffer gelangten bei p_H 5.2 und 4.0 Acetatpuffer, bei p_H 6.6 Phosphatpuffer zur Anwendung. Die Acetatpuffer waren etwa 1.5-, der Phosphatpuffer etwa 1.0-molar. Alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur vorgenommen. Der Gang der Spaltungen und Messungen war allgemein folgender (Einzelheiten s. unten): Die Substanz wurde zusammen mit dem ihrer Schwefelgruppe entsprechenden Überschuß an Natriummetabisulfit ($Na_2S_2O_5$) in Puffer gelöst. Nach bestimmten Zeiten wurde je 1 ccm entnommen und mit Acetatpuffer (p_H 5.2) und Phosphorwolframsäure¹⁷⁾ auf die erforderliche Konzentration gebracht. Die Messung erfolgte unmittelbar darauf im Zeiss-Pulfrich-Photometer, und die Extinktionskoeffizienten wurden auf eine S-Konzentration von 1×10^{-4} bzw. 1×10^{-3} g umgerechnet. Alle Lösungen wurden mit Hilfe von sauerstoff-freiem Stickstoff von Sauerstoff befreit. Ebenso wurde während der Versuche stets in einer Stickstoff-Atmosphäre gearbeitet. Nur so ließen sich zuverlässige Werte erhalten. Bei den Spaltungen des Neurotoxins wurde gleichzeitig mit der Entnahme für die optische Messung eine weitere Probe zur Bestimmung der Giftigkeit entnommen. Die Versuchsergebnisse sind in den Abbildungen 1, 2 und 3 zusammengestellt. Die Testung erfolgte in der mehrfach beschriebenen Weise an weißen Mäusen¹⁸⁾. Im folgenden wird jeweils ein Versuch beschrieben:

¹⁵⁾ R müßte natürlich ein durch Säure hydrolysierbarer Rest sein.

¹⁶⁾ Man kann sich durch einen einfachen Versuch davon überzeugen, daß bei Zusatz von Cystein zu einer Eiweiß-Hydrolyse (auch mit HCl-Ameisensäure) die Thiol-Reaktion verhältnismäßig schnell verschwindet (unveröffentlichte Versuche).

¹⁷⁾ Folin, Journ. biol. Chem. **106**, 311 [1934].

¹⁸⁾ Wir überzeugten uns, daß die geringen Bisulfitmengen ohne Einfluß auf den Tiertest waren.

Neurotoxin.

1) 13.95 mg ultrafiltriertes und dialysiertes Neurotoxin (*Naja tripudians*) wurden zusammen mit 10.29 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 10 ccm Phosphatpuffer (p_H 6.6) gelöst. Nach 0, 1, 2, 4, 6, 10, 12 und 18 Stdn. (vom Beginn gezählt) wurde je 1 ccm entnommen und mit 15 ccm Acetatpuffer (p_H 5.2) und 4 ccm Phosphorwolframsäure-Lösung versetzt. Die Messung erfolgte in 5 cm Mikro-Küvetten gegen eine Blindprobe von 15 ccm des gleichen Acetatpuffers, 4 ccm Phosphorwolframsäure und 1 ccm Bisulfit-Lösung der entsprechenden Konzentration. Zur Anwendung gelangte das Pulfrich-Zeiss'sche Stufenphotometer (Filter S 72).

2) 13.95 mg Neurotoxin (wie oben) und 10.29 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ wurden in 10 ccm Acetatpuffer (p_H 5.2) gelöst. Die optischen Messungen erfolgten nach der gleichen Behandlung wie oben, ebenso die Tierversuche.

3) 14.000 mg Neurotoxin (wie oben) wurden mit 13.880 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 10 ccm Acetatpuffer (p_H 4.0) gelöst. Die Messung und die Auswertung erfolgte wie bei den vorigen Versuchen. Die Reduktion der Phosphorwolframsäure war kaum stärker als bei der Blindprobe. Eine genaue Messung war wegen der bald auftretenden Trübung nicht auszuführen.

Cystin (III).

1) 14.0 mg Cystin wurden mit 14.0 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 10 ccm Phosphatpuffer (p_H 6.6) gelöst. Die Entnahme und Weiterbehandlung der Proben für die optische Messung erfolgte ganz analog dem für das Neurotoxin angegebenen Verfahren: Je 1 ccm der Spaltungslösung wurde mit 15 ccm Acetatpuffer (p_H 5.2) und 4 ccm Phosphorwolframsäurelösung verdünnt. Als Blindprobe diente eine Lösung von 15 ccm Acetatpuffer (p_H 5.2), 4 ccm Phosphorwolframsäure-Lösung und 1 ccm Wasser¹⁹⁾.

2) 14.0 mg Cystin wurden mit 14.0 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 10 ccm Acetatpuffer (p_H 5.2) gelöst. Die Messung erfolgte wie bei der vorigen Versuchsreihe.

Thiazolidin-carbonsäure-(4) (II).

1) 13.965 mg Thiazolidin-carbonsäure wurden mit 68.0 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 10 ccm Phosphatpuffer (p_H 6.6) gelöst. Die Entnahme und Weiterbehandlung der Proben (1 ccm) für die photometrische Messung erfolgte wie oben angegeben.

2) 13.71 mg Thiazolidin-carbonsäure wurden mit 68.0 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 10 ccm Acetatpuffer (p_H 5.2) gelöst. Die Messung erfolgt wie bei der vorigen Versuchsreihe.

Homo-cystein-lacton (I).

1) 12.188 mg Homo-cystein-lacton wurden mit 70 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 8.7 ccm Phosphatpuffer (p_H 6.6) gelöst und je 1 ccm der Lösung in der oben angegebenen Weise entnommen und zur optischen Messung weiterverarbeitet.

2) 12.188 mg Homo-cystein-lacton wurden mit 70 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 8.7 ccm Acetatpuffer (p_H 5.2) gelöst. Die Messung erfolgte wie beim vorigen Versuch.

Die Spaltung der Verbindungen I, II und III bei p_H 4.0 verlief unter analogen Reaktionsbedingungen sehr langsam. Die Ergebnisse wurden nicht in die Abbild. 3 aufgenommen.

¹⁹⁾ Es erwies sich als nicht erforderlich, der Blindprobe Sulfit zuzusetzen.