

Fermentchemische Untersuchungen an Spinnengiften.

I. Mitteilung: Über das Vorkommen von proteolytischen Fermenten und von Hyaluronidase in den Giften von *Lycosa raptoria* und *Ctenus nigriventer*.

Von
E. Kaiser.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien.

Mit 5 Abbildungen.

(Eingelangt am 2. März 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 12. März 1953.)

Es wird im Gegensatz zu bisherigen Beobachtungen festgestellt, daß Spinnengifte (untersucht wurden: *Lycosa raptoria* und *Ctenus nigriventer*) ein proteolytisches Ferment enthalten.

Ferner wird eine Trypsin aktivierende Kinase und das Vorkommen beträchtlicher Mengen Hyaluronidase nachgewiesen.

Spinnengifte spielen in der Pathologie europäischer Länder nur eine untergeordnete Rolle, während die durch Spinnenbisse hervorgerufenen Verletzungen in Südamerika eine ganz wesentliche Bedeutung besitzen. Hier sind es vor allem 2 Spinnengattungen, die schwere Vergiftungssymptome hervorrufen: *Lycosa raptoria* und *Ctenus nigriventer*. Die Bisse beider Spinnen führen in vielen Fällen zu einem tödlichen Ausgang^{1, 2, 3}. Die Gifte dieser beiden Gattungen wirken verschieden, aber die Giftsymptome sind bei jeder Gattung konstant und sehr charakteristisch. Das Gift der *Lycosa raptoria* erzeugt nur lokale Erscheinungen in Begleitung von größeren Ödemen und riesigen Hautnekrosen. Das Gift von *Ctenus nigriventer* führt dagegen zu sehr schmerzhaften nervösen Phänomenen, zu Krämpfen, Kontrakturen, allgemeinem Zittern, zu Hypothermie, starker Tachycardie, Arythmie und nach einigen Stunden kann der Tod unter Zuckungen eintreten.

¹ V. Brasil und J. Vellard, Seuchenbekämpfung Wien 7, 12 (1930).

² J. Vellard, Le venin des araignées. Paris (1936).

³ J. Vellard, Los animales venenosos. Lima (1947).

Der Giftapparat dieser Spinnengattungen besteht aus der oberhalb des starken, kräftig entwickelten Basalgliedes der Chelizeren, der klauenförmigen Mandibeln der Spinnen, oder in demselben liegenden, länglichen und von Muskeln umgebenen Giftdrüse und deren Ausführungsgang. Dieser durchsetzt sowohl das Basalglied als auch das zum Verwunden dienende, aber viel kleinere Endglied und mündet an dessen Spitze.

Das Sekret der Giftdrüse, das Spinnengift, ist eine klare, ölige Flüssigkeit, die wie bei den Schlangen nach rasch aufeinanderfolgenden Bissen bald erschöpft ist. Die Einverleibung des giftigen Sekretes erfolgt beim Beißen in die durch die Chelizeren gemachten Wunden.

Uns interessiert hier weniger das Problem des experimentellen „Araneismus“, noch das der Serumtherapie der Bißverletzungen, sondern der Gehalt der Spinnengifte an verschiedenen Fermenten. Spinnengifte sind in dieser Hinsicht fast nicht untersucht worden und wir haben uns hier die Aufgabe gestellt, *proteolytische Fermente* und das die Hyaluronsäure spaltende Ferment *Hyaluronidase* in den Spinnengiften nachzuweisen. Da derartige Fermente in Schlangengiften bereits wiederholte Male nachgewiesen werden konnten, wurden als Kontrolle auch Schlangengifte in die Untersuchungen einbezogen. Durch das freundliche Entgegenkommen des Institutes Butantan in Sao Paulo bzw. des Staatlichen Serotherapeutischen Institutes in Wien standen uns folgende Gifte zur Verfügung: Gifte von *Bothrops jararaca*, *Bothrops terrificus*, *Bothrops cotiara*, *Lycosa raptoria* sowie das Gift von *Ctenus nigriventer*.

A. Proteolytische Fermente.

Verschiedene Autoren haben proteolytische Fermente in Schlangengiften nachweisen können⁴⁻¹⁴, während proteolytische Fermente in Spinnengiften bisher nicht nachgewiesen werden konnten^{1, 2, 3, 15}.

⁴ S. N. Ganguly und M. T. Malkana, Indian J. Med. Res. **24**, 281 (1936).

⁵ S. N. Ganguly, Indian J. Med. Res. **24**, 287 (1936).

⁶ B. N. Ghosh, J. Indian Chem. Soc. **13**, 450 (1936).

⁷ B. N. Ghosh und D. K. Chowdhury, J. Indian Chem. Soc. **15**, 566 (1938).

⁸ B. N. Ghosh und S. S. De, J. Indian Chem. Soc. **13**, 627 (1936).

⁹ J. M. Goncalves und A. Polson, Arch. Biochemistry **13**, 253 (1947).

¹⁰ N. K. Iyengar, N. K. Dutt und B. Mukerji, Indian Med. Gaz. **77**, 409 (1942).

¹¹ N. K. Iyengar, K. B. Sehra und B. Mukerji, Indian J. Med. Res. **26**, 487 (1938).

¹² M. L. Kundu, S. S. De und B. N. Ghosh, J. Indian Chem. Soc. **14**, 564 (1937).

¹³ M. Sato und T. Hirano, Mem. Fac. Sci. Agric. Taihoku Imp. Univ. **9**, 83 (1935).

¹⁴ A. R. Taborda und L. C. Taborda, Mem. Inst. Butantan **14**, 181 (1940).

¹⁵ Walbum, zit. nach Anm. 1.

Methodik.

1947 hat *Kunitz*¹⁶ eine Methode zur Bestimmung der Proteolyse angegeben, die auf der Messung der Absorption von aus Substratlösungen (Casein usw.) frei gesetztem Tyrosin bzw. Tryptophan beruht. Gemeinsam mit *Pantlitschko* und *Andres*¹⁷ haben wir diese Methode modifiziert und hier neuerdings angewendet.

a) *Substrat*: 2,5 g Casein nach *Hammarsten* werden in wenig Wasser suspendiert, mit 30 ccm 0,1 n NaOH versetzt und durch vorsichtiges Schwenken das Casein ohne viel Schaumbildung in Lösung gebracht. Abschließend wird durch vorsichtiges Zugeben von 10 bis 12 ccm 0,1 n HCl auf ein pH von 7,4 gebracht. Das Zufügen der Salzsäure muß in Portionen erfolgen, wobei die nächste Portion immer erst dann zugesetzt werden darf, wenn das ausgefallene Casein wieder in Lösung gegangen ist. Normalerweise reichen 11,5 ccm 0,1 n Salzsäure aus, um den pH-Wert der Caseinlösung auf pH 7,4 einzustellen. Der pH-Wert der Lösung muß jedoch unbedingt mit einer Glaselektrode nachkontrolliert werden und durch Zugabe von Säure bzw. Lauge der Bereich zwischen pH 7,4 und 7,6 erreicht werden. Die Lösung ist, am Eis aufbewahrt, etwa 1 Woche beständig. Zusätze von Konservierungsmitteln sind nach Tunlichkeit zu vermeiden, da diese Stoffe meistens eine Absorption im Ultravioletten zeigen.

Für die Bestimmung der pH-Abhängigkeitskurven wurde die Caseinlösung durch Zugabe von 0,1 n Säure bzw. Lauge auf das gewünschte pH eingestellt (pH 5,8 bis 9,0).

b) *Fermentlösung*: Die Methode gestattet es, 10 bis 15 γ Handelstrypsin (*Merck, Grübler*) bzw. 0,5 bis 1,0 γ kristallisiertes Trypsin (*Armour*) in 3 ccm Substrat Enzym-Puffergemisch nachzuweisen.

c) *Giftlösungen*: 20 mg des über Phosphorperoxyd getrockneten Giftes wurden in 10 ccm destilliertem Wasser gelöst.

d) *Puffer*: *McIlwaine*-Standardpuffer bzw. Ammonchlorid-Ammoniak-Puffer.

e) *Durchführung der Bestimmung*: Zu 1 ccm Substratlösung, 1 ccm Puffer werden nach Temperatúrausgleich im Wasserbad bei 37° 1 ccm vorgewärmte Fermentlösung (bzw. Giftlösung) zugesetzt. Die Bebrütungsdauer betrug 1 Std. Nach der Inkubierung werden 3 ccm 16%ige Trichloroessigsäure zugesetzt und filtriert. Man kann das Filtrat nun direkt verwenden, besser jedoch ist es, 3 ccm Filtrat mit 3 ccm 20%iger Natronlauge zu versetzen und nach gutem Durchmischen zu photometrieren. Als UV-Spektrophotometer kann jeder beliebige Apparat verwendet werden (*Beckman, Hilger, Unicam*). Gemessen wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 290 $m\mu$. Als Leerprobe wird ein sofort nach Zugabe des Fermentes enteiweißter Ansatz verwendet.

Zwischen der Extinktion und dem Tyrosin-Tryptophangehalt der enteiweißten Lösung einerseits und dem Tyrosin-Tryptophangehalt und der Fermentkonzentration andererseits besteht eine einfache, lineare Be-

¹⁶ *M. Kunitz*, J. Gen. Physiol. **30**, 291 (1947).

¹⁷ *M. Pantlitschko, E. Kaiser* und *H. Andres*, Biochem. Z. **322**, 526 (1952).

ziehung, die die Errechnung der Fermentkonzentration bzw. Fermentwirksamkeit ermöglicht.

Die Abb. 1 zeigt die Wirksamkeit der verschiedenen untersuchten Gifte in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. Die Gifte von *Bothrops jararaca*, *Bothrops cotiara* und *Bothrops terrificus* zeigen eine relativ starke proteolytische Aktivität, wobei das pH-Optimum bei Verwendung von Casein als Substrat bei allen drei Giften bei etwa pH 8,5 liegt. Die Spinnengifte (Gifte von *Lycosa raptoria*, *Ctenus nigriventer*) sind wesentlich schwächer wirksam, doch zeigen sie ebenfalls eine proteolytische Aktivität. Die optimale Aktivität liegt bei den Spinnengiften mehr gegen den Neutralpunkt verschoben. Das pH-Optimum des Giftes von *Lycosa raptoria* liegt bei pH 7,5, während das des Giftes von *Ctenus nigriventer* bei pH 8,0 liegt. Auffällig ist überdies noch das wesentlich breitere pH-Optimum der beiden untersuchten Spinnengifte.

Führt man nun eine Berechnung der proteolytischen Aktivität, bezogen auf die Wirkung von kristallisiertem Trypsin durch, so gelangt man zu den in Tabelle 1 angeführten Werten.

Die beschriebene proteolytische Aktivität der Spinnengifte ist besonders aus dem Grunde bemerkenswert, da andere Autoren^{1, 2, 3, 15} keine proteolytische Wirksamkeit der Spinnengifte nachweisen konnten. Die negativen Resultate der zitierten Autoren führen wir in erster Linie darauf zurück, daß die verwendete Methode eine Erfassung der Proteolyse nicht gestattete. Erst mit der von uns angewendeten Methode, die, wie bereits oben ausgeführt wurde, eine wesentlich höhere Empfindlichkeit besitzt, war es möglich, die proteolytische Wirkung der Spinnengifte nachzuweisen.

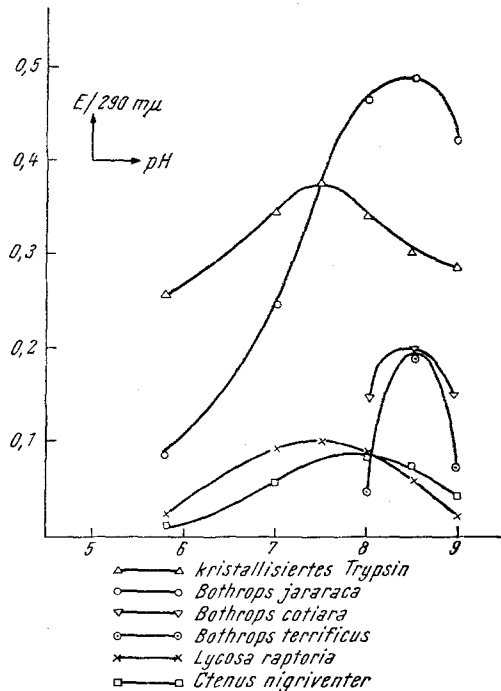


Abb. 1. Abhängigkeit der proteolytischen Wirksamkeit der untersuchten Gifte von der Wasserstoffionenkonzentration im Vergleich zur Wirkung von kristallisiertem Trypsin (Armour).

Tabelle 1. Gehalt der untersuchten Gifte an proteolytischen Fermenten pro Milligramm, bezogen auf kristallisiertes Trypsin (*Armour*).

Gift von	Extinktion bei 290 m μ (saure Lösung)	Entspricht γ kristallisiertes Trypsin	γ kristallisiertes Trypsin pro m μ Gift
Bothrops jararaca	0,494 (pH 8,5)	13,0	19,5
Bothrops cotiara	0,194 (pH 8,5)	5,2	7,8
Bothrops terrificus	0,193 (pH 8,5)	5,2	7,8
Ctenus nigriventer	0,085 (pH 8,0)	2,3	3,5
Lycosa raptoria	0,101 (pH 7,5)	2,7	4,1
Kristallisiertes Trypsin (<i>Armour</i>) ..	0,375 (pH 7,5)	10,0	—

B. Aktivierende Wirkung auf Trypsin (Kinasewirkung).

In der Literatur finden sich einige Angaben über die aktivierende Wirkung von Schlangengiften auf inaktives Pankreassekret bzw. auf Pankreastrocknenpulver-Glycerinextrakte. So berichtet *Delezenne*¹⁸, daß Schlangengifte eine Kinase enthalten, die inaktives Pankreassekret zu aktivieren vermag. Auch *Sato* und *Hirano*¹⁹ haben ähnliche Beobachtungen machen können. Die zitierten Autoren konnten zeigen, daß die Gifte verschiedener Schlangen (*Trimeresurus mucrosquamatus* und andere) eine aktivierende Wirkung auf Glycerin-Pankreasextrakte besitzen. Auch die Peptidasewirkung gegen Leucylglycin und Alanylglycin soll durch verschiedene Schlangengifte aktiviert werden, wie *Tsuchiya*^{20, 21} nachweisen konnte. Da unseres Wissens derartige Untersuchungen mit Spinnengiften bisher noch nicht angestellt wurden, haben wir die Gifte von *Lycosa raptoria* und *Ctenus nigriventer* in bezug auf ihre aktivierende Wirkung gegen Glycerin-Pankreasextrakte im Vergleich zu Schlangengiften untersucht.

Methodik.

Lösungen von Spinnen- bzw. Schlangengiften (2 mg in 100 ccm) wurden zu Glycerin-Pankreasextrakten, die nach der Methode von *Sato* und *Hirano*¹⁹ hergestellt wurden, zugesetzt und die Mischung verschieden lang bei 37° im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubierungszeit wurde Casein als Substrat zugesetzt und die Mischung abermals 1 Std.

¹⁸ *C. Delezenne*, zit. nach Anm. 19.

¹⁹ *M. Sato* und *T. Hirano*, Mem. Fac. Sci. Agric. Taihoku Imp. Univ. 9, 105 (1935).

²⁰ *Y. Tsuchiya*, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan 11, 135 (1935).

²¹ *Y. Tsuchiya*, Mem. Fac. Sci. Agric. Taihoku Imp. Univ. 9, 137, 161, 179, 277 (1936).

bei 37° bebrütet. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Aktivität nach der oben beschriebenen Methode bestimmt.

Die Abb. 2 zeigt die aktivierende Wirkung der verschiedenen untersuchten Gifte. Die Aktivität wurde als Zunahme der Extinktion (gemessen in saurer Lösung bei 290 m μ) im Vergleich zur Leerprobe (gleich behandelter Glycerin-Pankreasextrakt ohne Giftzusatz) angegeben. Es zeigt sich, daß die Kinaseaktivität der Gifte von *Lycosa raptor* bzw. von *Ctenus nigriventer* größer ist als die von *Bothrops cotiara*.

Die Abb. 3 zeigt den Einfluß der Inkubierungszeit von Giftlösung und Pankreasextrakt auf die aktivierende Wirkung gegen Casein als Substrat. Die völlige Aktivierung tritt bereits nach zirka 60 Min. ein, um dann nur mehr unmerklich zuzunehmen, wenn Giftkonzentrationen von etwa 0,02 mg/3 ccm (*Ctenus nigriventer*) verwendet werden. Höhere Konzentrationen führen zu keiner Steigerung der Aktivierung, während geringere Konzentrationen (0,002 mg/3 ccm) nur eine geringere Aktivierung bewirken.

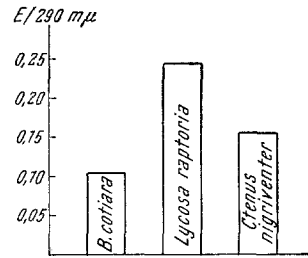


Abb. 2. Aktivierung von Trypsin (Glycerin-Pankreasextrakte) durch die Kinase von Spinnen- und Schlangengiften.

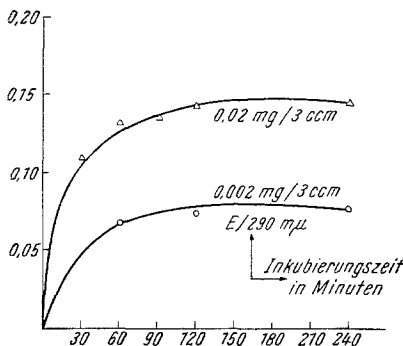


Abb. 3. Einfluß der Inkubierungszeit auf die Kinasewirkung des Giftes von *Ctenus nigriventer*.

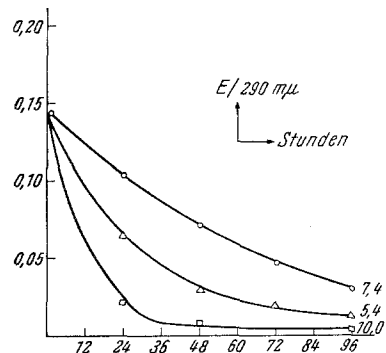


Abb. 4. Einfluß der Wasserstoffionkonzentration auf die Stabilität der Kinase des Giftes von *Ctenus nigriventer*.

Abschließend wurde die Stabilität der Kinasewirkung des Giftes von *Ctenus nigriventer* in Abhängigkeit von der Wasserstoffionkonzentration und von der Temperatur untersucht. Die Abb. 4 zeigt die aktivierende Wirkung des Giftes von *Ctenus nigriventer* in Abhängigkeit von der Zeit und vom pH. Die Stabilität ist stark vom pH der Lösung abhängig. Am stabilsten sind Lösungen, die bei pH 7,4 aufbewahrt werden, während stärker alkalische Lösungen (pH 10,0) zu einem raschen Absinken der Aktivität führen. Bei pH 10,0 ist die Aktivität nach 24 Stdn. praktisch

auf Null gesunken. In schwach saurer Lösung (pH 5,4) ist die Kinase wesentlich stabiler.

Die Stabilität der Kinase ist neben der Wasserstoffionenkonzentration auch von der Temperatur abhängig. Wie die Abb. 5 zeigt, ändert sich die Aktivität bei einer Temperatur von 30° innerhalb von 180 Min. praktisch nicht, um bei 55° bereits nach 30 Min. fast völlig inaktiviert zu werden.

C. Hyaluronidase.

Das Vorkommen des Fermentes Hyaluronidase in tierischen Organen und bei verschiedenen Bakterienstämmen ist allgemein bekannt^{22, 23}.

Uns interessiert hier vor allem das Vorkommen von Hyaluronidase in Giften von Insekten bzw. von gewissen Schlangen. Über diese Frage liegen bereits verschiedene Untersuchungen vor und das Vorkommen von Hyaluronidase in Schlangengiften gilt heute bereits als sicher gestellt²²⁻³³. Hingegen soll der „Spreading Factor“ des Bienengiftes nicht mit Hyaluronidase identisch sein³⁰. Über den Gehalt von Spinnengiften an Hyaluronidase liegen unseres Wissens bisher keine Untersuchungen vor. Wir haben deshalb die Gifte von *Lycosa raptoria* und *Ctenus*

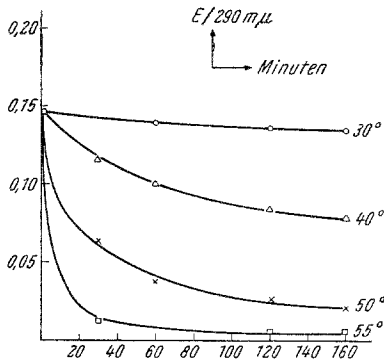


Abb. 5. Einfluß der Temperatur auf die Stabilität der Kinase des Giftes von *Ctenus nigriventer*.

nigriventer im Vergleich zu den Schlangengiften auf ihren Hyaluronidasegehalt untersucht.

Die Annahme, daß in Spinnengiften Hyaluronidase vorkommt, ist keineswegs von der Hand zu weisen, da z. B. Bißverletzungen durch *Lycosa raptoria* lokale Erscheinungen hervorrufen, die sich in ausge dehnten Ödemen manifestieren. Wird z. B. Meerschweinchen oder Ratten

²² K. Meyer, *Physiol. Rev.* **27**, 335 (1947).

²³ H. Gibian, *Angew. Chem.* **63**, 105 (1951).

²⁴ F. Duran-Reynals, *Science* **83**, 286 (1936).

²⁵ F. Duran-Reynals, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **38**, 763 (1938).

²⁶ G. Tabarini-Castellani, *Arch. ital. med. sper.* **2**, 969 (1938).

²⁷ F. W. Eichbaum, *Mem. Inst. Butantan* **20**, 95 (1947).

²⁸ D. McLean and C. W. Hale, *Chem. and Ind.* **59**, 347 (1940).

²⁹ E. A. Zeller, *Adv. Enzymology* **8**, 449 (1948).

³⁰ E. Werle, F. Turtur und R. Bauereis, *Biochem. Z.* **319**, 337 (1949).

³¹ E. Chain und E. S. Duthie, *Brit. J. Exp. Pathol.* **21**, 324 (1940).

³² G. Favilli, *Nature* **145**, 866 (1940).

³³ R. de Marco, *Arch. scienze biol.* **27**, 446 (1941).

das Gift von *Lycosa raptor*a subkutan oder intramuskulär gespritzt, so entsteht an Ort und Stelle ein ziemlich ausgedehntes Ödem, das nach 24 bis 48 Stdn. wieder gänzlich abgeklungen ist. Es entspricht zumindest diese Teilreaktion völlig einer Injektion von Hyaluronidase in das Unterhautzellgewebe, die ebenfalls zu einer Lockerung der Bindegewebsgrundsubstanz, und wenn man so sagen will, zu einer Ödembildung führt. Auch diese Reaktion verschwindet bekanntlich nach relativ kurzer Zeit.

Methodik³⁴.

Viskosimetrische Bestimmung der Hyaluronidaseaktivität im *Ostwald*-Viskosimeter bei 37,5°. Verwendet wurden Viskosimeter mit einer durchschnittlichen Durchlaufzeit für Wasser von 59 bis 60 Sek.

a) *Substrat*: 0,2 bis 0,4%ige wäßr. Hyaluronsäurelösung, die nach der von *Jancik* und *Kaiser*³⁵ angegebenen hergestellt wurde.

b) *Ferment*: Handelshyaluronidase („*Kinaden*“ *Schering*) bzw. Lösungen von Spinnen- bzw. Schlangengiften (20 mg in 10 ccm).

c) *Puffer*: *McIlwaine*-Standardpuffer + 0,35% NaCl bei pH 7,0.

Die Tabelle 2 zeigt die Wirkung der untersuchten Gifte auf die Viskosität von Hyaluronsäure. Als Vergleich und zur Ermöglichung der genauen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde auch ein Hyaluronidase-Standardpräparat („*Kinaden*“ *Schering*) in verschiedenen Verdünnungen untersucht. Es zeigt sich, daß sowohl das Gift von *Lycosa raptor*a als auch das von *Ctenus nigriventer* eine deutliche Hyaluronidaseaktivität besitzen.

Tabelle 2.

Gift von	Halbwertszeit Min.	Einheiten	Einheiten Hyaluronidase pro mg Gift (bezogen auf Kinaden)
Standardhyaluronidase („ <i>Kinaden</i> “ <i>Schering</i>)	30	0,7	—
	15	0,8	—
	9	0,9	—
	6	1,0	—
<i>Bothrops jararaca</i> (20 mg/10 ccm)	9	0,9	0,45
<i>Bothrops terrificus</i> (20 mg/10 ccm)	4,5	1,1	0,55
<i>Ctenus nigriventer</i> (10 mg/10 ccm)	29	0,7	0,70
<i>Lycosa raptor</i> a (10 mg/10 ccm)	15,5	0,8	0,80

Obwohl die hier angegebenen Werte nur Näherungswerte sind, da, wie wiederholte Untersuchungen ergaben, die Giftpräparate ziemlich

³⁴ *M. Pantlitschko* und *E. Kaiser*, *Biochem. Z.* **322**, 137 (1951).

³⁵ *W. E. Jancik* und *E. Kaiser*, *Nature* **169**, 114 (1952).

inhomogen waren, geht daraus eindeutig hervor, daß die Spinnengifte wesentlich mehr Hyaluronidase enthalten als die Schlangengifte.

An anderer Stelle haben wir gemeinsam mit *Pantlitschko*³⁴ zeigen können, daß die Hyaluronidaseaktivität durch Einstellen der Fermentlösung für 30 Min. in ein Wasserbad von 60° bzw. durch Bestrahlung mit einer UV-Lampe aus 33 cm für 30 Min. völlig inaktiviert wird. Werden die von uns hier verwendeten Giftlösungen ebenso behandelt, so kann nach der angegebenen Zeit keine Hyaluronidaseaktivität mehr festgestellt werden.

Für die Überlassung von Spinnen- und Schlangengiften sind wir Herrn Prof. *Dorival da Fonseca Ribeiro* vom Institut Butantan (Sao Paulo), sowie Herrn Dr. *Teichmann* vom Bundesstaatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien zu großem Dank verpflichtet.