

# Über hämolytisch wirksame Stoffe in Molchgiften

Von

**H. Bachmayer und H. Michl**

Aus dem Chemischen Institut der Hochschule für Bodenkultur, Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 10. April 1965)

In den Hautsekreten von Molchen wurden Amylasen, Phosphatasen, Arylamidasen und z. T. stark hämolytisch wirkende Proteine nachgewiesen und durch Chromatographie an Sephadex und Gel-Elektrophorese charakterisiert. Die Zusammensetzung scheint mehr vom Biotop als von den verwandtschaftlichen Beziehungen abzuhängen.

Amylases, phosphatases and arylamidases were demonstrated in newt venoms. In some of these hemolytically active proteins were proved to occur and characterized by chromatography on Sephadex and by gel-electrophoresis. The composition of the venoms seems to depend more on the biotop than on phylogenetic relations.

Die Haut der Amphibien ist von einer dünnen Schleimschicht bedeckt. Dieser Schleim stellt das Sekret besonderer Hautdrüsen dar. Durch mechanische, chemische, thermische oder elektrische Reize wird diese Sekretion verstärkt, wobei das Sekret in Form einer schaumigen Masse auftreten kann. Diese Sekrete haben nicht nur die Aufgabe, die Feuchtigkeit der Amphibienhaut und damit die Hautatmung aufrecht zu erhalten, sie bieten den Tieren auch einen gewissen Schutz gegen Mikroorganismen und Algenbewuchs sowie gegen natürliche Feinde. Erwartungsgemäß sind die Hautsekrete schnell beweglicher Arten wie *Rana dalmatina* wesentlich weniger biologisch aktiv als etwa das der viel schwerfälligeren Unken (*Bombina*)<sup>1</sup>.

Ein ähnliches Verhalten wie die Unken zeigt der im gleichen Biotop lebende Kammmolch *Triturus cristatus*. Zoologisch rechnet man jedoch die

---

<sup>1</sup> G. Kiss und H. Michl, *Toxicon* [Oxford] **1**, 33 (1962).

Molche zur gleichen Familie wie die Salamander. Ein charakteristischer Bestandteil der Unkengifte sind hämolytisch wirksame Proteine und Peptide, der Salamandergifte hingegen alkaloidähnliche Verbindungen wie das Samandarin<sup>2</sup>. Uns interessierte nun, ob die Hautsekrete der Molche näher dem der Unken oder dem der Salamander stehen, also ob sie mehr durch das Biotop oder durch phylogenetische Beziehungen geprägt sind.

Tabelle 1. Zusammensetzung von Molchgiften

Art	<i>Triturus cristatus</i>	<i>Triturus vulgaris</i>	<i>Triturus pyrrhogaster</i>
mg lyophilisiertes Gift/Tier	12 mg	1,2 mg	6,0 mg
mg lyophilisiertes Gift/Gramm Tier	1,2 mg	0,9 mg	1,3 mg
hämolytische Aktivität	1:2 000 000	1:30 000	1:200 000
Amylase	+	+	+
LNA-spaltendes Enzym	+	+	+
saure Phosphatase	+	+	+
Phospholipase	—	—	—
Peptide	<i>R<sub>F</sub></i> (Papierchromatographie) 0,58 ++ 0,70 (+) <i>HVE</i> bei pH 4,7 neutral	—	(+) nur mit Ninhydrin anfärbbar  <i>HVE</i> bei pH 4,7 anodisch wandernd
freie Aminosäuren	Ala, $\gamma$ -Abs, Asp, Glu, Gly, His, (Ileu + Leu), Ser, Try, Tyr, Val	Ala, $\gamma$ -Abs, Asp, Glu, Gly, His, Ileu + Leu, Pro, Ser, Val	Ala, ( $\gamma$ -Abs), Asp, Glu, Gly, (Ileu + Leu), Phe, Ser, Val
5-Hydroxytryptamin	—	—	—
Steroide (Cholesterin)	0,01 %	0,01 %	0,03 %
Kohlenhydrate	+	+ <sup>4</sup>	—
pH des Rohsekretes	5,1	6,2	6,5
Gesamttoxizität, <i>DLM</i> Maus (s. c.)	20 $\mu\text{g/g}^3$	6,7 $\mu\text{g/g}^4$	

<sup>2</sup> C. Schöpf, *Experientia* [Basel] **17**, 285 (1961).<sup>3</sup> K. Schübl zitiert nach <sup>5</sup>.<sup>4</sup> S. Maki, *Arch. exper. Pathol. Pharmakol.* **104**, 100 (1924).

Einen Hinweis findet man in der Literatur. Die Sekrete von Triturusarten rufen nicht die charakteristischen Krampferscheinungen des Samandarins hervor, sondern bewirken eine starke örtliche Reizung, die zu schmerzhaften Sensationen und schweren hämorrhagischen Entzündungen an der Injektionsstelle führt. Gessner<sup>5</sup> nimmt einen „Saponin“-Charakter des Giftes an.

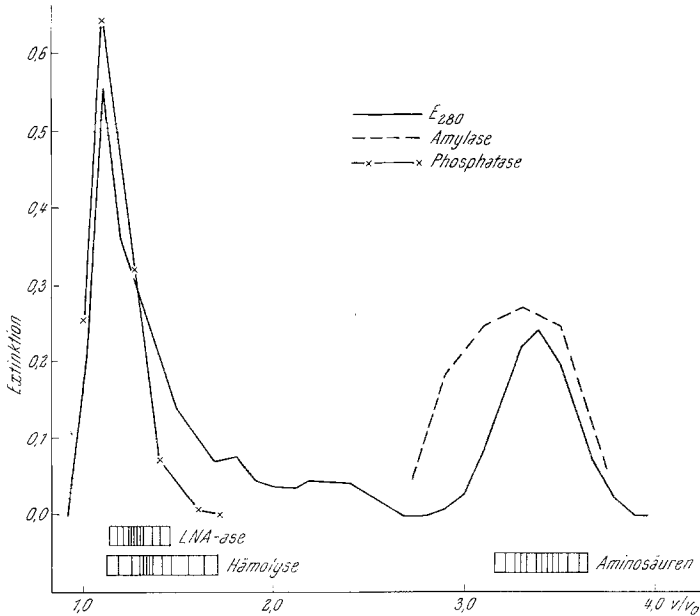


Abb. 1. Chromatographie von Triturus-cristatus-Sekret an Sephadex G-75

Die Tab. 1 gibt nun eine Übersicht über die Zusammensetzung des Hautsekretes der heimischen Molche Triturus cristatus und Triturus vulgaris sowie des japanischen Feuerbauchmolches Triturus pyrrhogaster. Ähnlich wie im Unkengift kommen freie Aminosäuren<sup>6</sup>, Amylase<sup>7</sup>, ein Leucylnaphthylamid-spaltendes Enzym<sup>8</sup> und Phosphatasen<sup>9</sup>, aber kein 5-Hydroxytryptamin vor<sup>10</sup>. Am auffälligsten ist jedoch die starke hämolytische Aktivität, vor allem des Giftes von Triturus cristatus. Diese Wirkung könnte durch niedermolekulare oberflächenaktive Stoffe,

<sup>5</sup> O. Gessner, „Tierische Gifte“, in Hdb. exper. Pathologie, Erg. Werk, Bd. 6, Berlin 1938.

<sup>6</sup> H. Michl und H. Bachmayer, Mh. Chem. **95**, 480 (1964).

<sup>7</sup> H. Michl und A. Pastuszyn, Mh. Chem. **95**, 978 (1964).

<sup>8</sup> H. Michl und H. Molzer, Toxicon [Oxford] **2**, 281 (1965).

<sup>9</sup> J. Andres, Dissertation, 1965, Wien.

<sup>10</sup> V. Erspamer, G. Bertaccini und N. Urakawa, Japan. J. Pharmacol. **14**, 468 (1964).

etwa Saponine, hervorgerufen werden. Dagegen sprechen u. a. die Hitze-  
 labilität der hämolytisch wirksamen Verbindungen und der Befund, daß  
 proteolytische Fermente die hämolytische Wirkung zerstören. Bei der  
 Gelchromatographie an Sephadex G-75 und G-200 verhält sich das hämo-

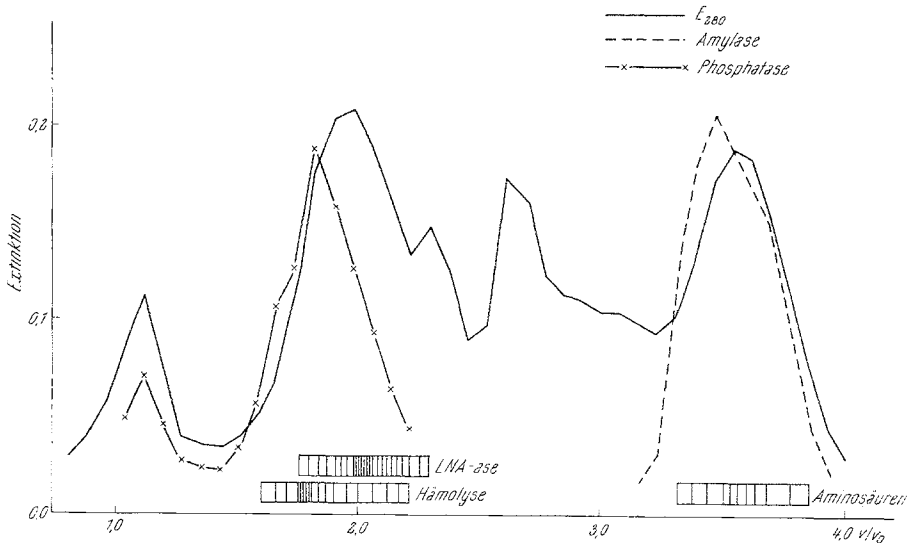


Abb. 2. Chromatographie von Triturus-cristatus-Sekret an Sephadex G-200

lytische Prinzip wie ein Stoff mit einer Teilchengröße von etwa 45 000  
 (Abb. 1 und 2). Steroide kommen ferner (Tab. 1) nur spurenweise im  
 Molchgift vor. Damit scheidet die genannte Möglichkeit, die hämolytische  
 Aktivität des Molchgiftes zu erklären aus. Nach den Ergebnissen der Gel-  
 filtration und der Inaktivierung durch  
 Kochen und proteolytische Fermente  
 muß es sich um ein Protein handeln.  
 Dieses könnte eine Lecithinase, die  
 indirekt über Lysolecithin hämoly-  
 tisch wirkt, sein oder aber ein direkt  
 hämolytisch wirkendes Protein dar-  
 stellen. Der negative Ausfall aller  
 Lecithinasereaktionen des Vollgiftes

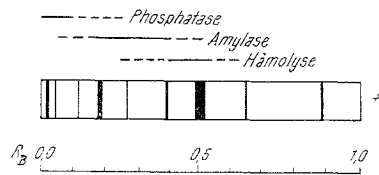


Abb. 3. Disc-Elektrophorese von Triturus-cristatus-Sekret; in Polyacrylamidgel, Tris pH 8,9

bzw. der aktiven Fraktionen läßt nur mehr letztere Möglichkeit zu. Es  
 handelt sich also wie beim hitzelabilen Prinzip des Unkengiftes bzw. wie  
 bei verschiedenen Schlangengiften um ein direkt hämolytisches Protein.

Diese Ergebnisse zeigen ebenso wie der negative Ausfall von Ver-  
 suchen, Samandarin im Molchgift nachzuweisen, daß das Hautsekret von  
 Triturus cristatus weitaus ähnlicher dem der im gleichen Biotop lebenden  
 Unken als dem der verwandten Salamander ist.

Bei der Gelchromatographie läßt sich kein Unterschied zwischen den hämolytisch wirksamen Proteinen aus Unken- bzw. Molchgift finden. Beide werden z. B. aus Sephadex G-200 etwa mit dem 1,9fachen „void“-Volumen eluiert. Bei der Elektrophorese in Polyacrylamidgelen bei pH 8,9 zeigt sich jedoch ein deutlicher Unterschied: Das hämolytische Prinzip aus Unkengift bleibt am Start, das hämolytische Prinzip aus dem Molchgift wandert jedoch mit 50% der Geschwindigkeit von Bromphenolblau (s. Abb. 3).

### Experimenteller Teil

*Gewinnung der Sekrete.* Diese geschah auf die früher<sup>1</sup> für Unken beschriebene Weise durch Reizung der Hautdrüsen mit Äther und Lyophilisieren der wässrigen Lösung. Der pH der Giftsekrete wurde mit der Glaselektrode gegen Standardpuffer gemessen.

*Hämolyse-Test:* Aus den Trockensekreten wurden Verdünnungsreihen in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und nach 8 Stdn. der Grad der Hämolyse gegen menschliche Erythrozyten notiert. Eine zweite Versuchsreihe wurde vorher in Lösung 10 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt.

*Prüfung mit Trypsin.* Zur Prüfung auf Zerstörung der Aktivität durch Proteolyse wurde je 1 mg der Trockensekrete mit 0,1 ml einer Lösung von 0,2 mg Trypsin/ml 0,01*M*-Ammonacetatpuffer pH 8,1 4 Stdn. bei 37° bebrütet. Nach dem Lyophilisieren wurde der Rückstand zur Austestung der hämolytischen Aktivität in physiologischer NaCl gelöst.

*Dotterkoagulationstest* (Prüfung auf Phospholipasen). Es wurde die Hemmung der Koagulationszeit für Eidotter in physiologischer Lösung nach 2stdg. Bebrüten bei 37° C mit Sekretlösungen bzw. Fraktionen davon gemessen.

*Amylase.* Das Verschwinden der Blaufärbung von Amylose mit Jod-KJ nach 2stdg. Bebrüten mit Lösungen der Trockensekrete bzw. einzelner Fraktionen (37° C, Phosphatpuffer pH 6,2) wurde als Maß für die Enzymaktivität genommen. Die Amylaseaktivität wurde bei der Gelfiltration an Sephadex G-75 um einen Faktor 6 angereichert, an Sephadex G-200 um den Faktor 29. Im Vergleich zu den anderen Enzymaktivitäten ist die Anreicherung hier größer als zu erwarten. Dies ist jedoch dadurch erklärbar, daß die Amylase durch spezifische Wechselwirkung mit dem Dextran-Gel eine Retention erfährt und dadurch von allen Proteinen abgetrennt wird.

*Phosphatase.* Als Substrat wurde p-Nitrophenylphosphat (Fluka) verwendet und die nach 2stdg. Bebrüten (37° C, Phthalatpuffer pH 5,0) auftretende Gelbfärbung nach Zugabe von 0,1*n*-NaOH spektrophotometrisch bei 405  $\mu$  gemessen. Die Anreicherung betrug nach Sephadex G-75 3,7 und nach Sephadex G-200 2,8.

„*Leucynaphthylamid-spaltendes Enzym*“ (LNA-ase). Das durch die Enzymaktivität nach Bebrüten bei 37° C (2 Stdn., Trispuffer pH 7,3) abgespaltene  $\beta$ -Naphthylamid wurde durch Kuppeln mit diazotiertem 3-Chlor-4-nitroanilin (Echtrot 3 GL) und Messung des mit Äthylacetat extrahierbaren roten Farbstoffes bei 546  $\mu$  bestimmt. Anreicherung bei Sephadex G-75 auf das 2fache, bei Sephadex G-200 auf das 2,8fache.

*Gelfiltration an Sephadex.* In physiologischer NaCl-Lösung gequollenes Sephadex G-75 bzw. G-200 wurde zur Säule gepackt. Verwendete Säulendimensionen: 150 × 1 cm bei G-75 und 100 × 2 cm bei G-200. Das „void volume“ wurde mit „Blue dextran“ zu 52 ml (G-75) und 80 ml (G-200) ermittelt. Von der in oben beschriebener Weise gewonnenen wäfr. Sekretlösung wurden je 10 ml durch Zusatz von 90 mg NaCl „physiologisch gemacht“. Von einem anderen Teil der Lösung wurde der Gehalt an Trockengift durch Lyophilisieren ermittelt. Von den physiologischen Lösungen wurden 8 ml (G-75) bzw. 10 ml (G-200) auf die Säule aufgebracht und mit 0,9proz. NaCl eluiert. Fraktionen von je 5 ml wurden gesammelt und auf ihre hämolytische und Enzymwirksamkeit untersucht. Die Extinktionen bei 280 m $\mu$  wurden gemessen, die Aminosäuren durch Tüpfeln mit Ninhydrin lokalisiert.

*Dünnschichtchromatographie der freien Aminosäuren.* Zur Anreicherung der Aminosäuren wurde eine 1proz. Lösung der Trockensekrete in Pyridinacetatpuffer pH 4,7 mit einem 6fachen Überschuß an Aceton bei 0° C gefällt. Der Überstand wurde durch Rotationsverdampfen vom Aceton befreit und anschließend lyophilisiert. Die Chromatographie der Aminosäuren auf Kieselgel G erfolgte wie früher<sup>6</sup> beschrieben. Flecken von Peptiden verschwanden bei der Hydrolyse mit 6*n*-HCl.

*Charakterisierung von Peptiden.* Es wurden die  $R_F$ -Werte bei der Papierchromatographie auf SS 2043 b mit *n*-Propanol—Puffer 4,7 (2:1) als Laufmittel, und die Beweglichkeiten bei der Hochvoltelektrophorese in Pyridinacetatpuffer pH 4,7 ermittelt. Anfärbung mit Bromphenolblau in sublimatgesättigtem Äthanol.

*Abschätzung des Cholesterin-Gehaltes.* 5 mg gepulvertes Trockensekret wurden über Nacht mit 20 ml rückstandsfreiem CHCl<sub>3</sub> extrahiert, filtriert und die getrockneten Filtrate auf Kieselgel G-Platten in CHCl<sub>3</sub>—Methanol (99:1) chromatographiert. Die Sichtbarmachung erfolgte mit 50proz. Phosphorsäure. Durch gleichzeitige Chromatographie steigender Mengen einer Standard-cholesterinlösung ließ sich der Gehalt in den einzelnen Sekreten gut abschätzen. Bei den untersuchten Sekreten war regelmäßig eine schnell wandernde Nebenkomponente schwach grau anfärbbar, bei der es sich vermutlich um ein Triglycerid handelt.

*Disc-Elektrophorese in Polyacrylamidgel.* Diese wurde in der von Michl und Pastuszyn<sup>11</sup> beschriebenen Weise durchgeführt.

Verwendet wurde ein 6proz. Gel in Tris—HCl-Puffer, pH 8,9. Die Elektrophorese erfolgte 2 Stdn. bei 110 V. Angefärbt wurden die Proteine mit Amidoschwarz 10 B. Die Wanderungsgeschwindigkeit bezog man auf zugefügtes Bromphenolblau. Zur Lokalisierung der Enzymaktivitäten wurden weitere Gelsäulchen in Scheiben von 2 mm Dicke geschnitten und über Nacht mit dem für das betreffende Enzym optimalen Puffer eluiert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie oben angegeben. Zur Lokalisierung der hämolytischen Aktivität eluierte man mit physiolog. NaCl.

*Prüfung auf Salamander-Alkaloide.* Ein Extrakt von Trockensekret mit CHCl<sub>3</sub> wurde auf Kieselgel G mit dem Laufmittel Diäthylamin—Cyclohexan (1:9)<sup>12</sup> chromatographiert. Die Anfärbung erfolgte mit dem von Munier<sup>13</sup> modifizierten Dragendorff-Reagens.

<sup>11</sup> H. Michl und A. Pastuszyn, Mikrochim. Acta [Wien] 1963, 880.

<sup>12</sup> G. Habermehl, Ann. Chem. 679, 164 (1964).

<sup>13</sup> R. Munier, Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 1225 (1953).

*Prüfung auf Kohlenhydrate.* 10 mg Trockensekret hydrolysierte man mit 1*n*-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nach Abtrennen des Sulfates mit BaCO<sub>3</sub> wurde die eingeeengte Lösung aufsteigend mit n-Butanol—Eisessig—Wasser (4:1:5, v/v, obere Phase) chromatographiert. Die Kohlenhydrate wurden mit Anilinphthalat sichtbar gemacht.

Die Enzymbestimmungen wurden zum Teil von *J. Andres, H. Molzer* und *A. Pastuszyn* durchgeführt.

Dem US Government wird für die Unterstützung dieser Arbeit herzlich gedankt.