

Analytische Untersuchungen des Wehrsekretes von *Peripatopsis moseleyi* (Onychophora) *

Analytical Investigations of the Defensive Secretion
from *Peripatopsis moseleyi* (Onychophora) *

Harald Röper

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg

(Z. Naturforsch. **32 c**, 57–60 [1977]; eingegangen am 8. September 1976)

Peripatopsis moseleyi, Defensive Secretion, Analysis

The defensive secretion of *Peripatopsis moseleyi* (Onychophora) consists of 84% water and 16% protein and free amino acids. The secretion's defensive effectiveness is an anti-predator "sticking" action. The secretion is flung out of the oral papillae in liquid state. It is then denaturated by the air and develops increasingly sticky white threads, probably through the development of disulfide bridges from the protein content.

The elastic properties of the secretion threads indicate a micellar structure. The defensive secretion contains no volatile organic components or carbohydrates. This was confirmed by gas-liquid chromatography and thin-layer chromatography.

After acidic hydrolysis of the secretion the following amino acids were determined quantitatively: aspartic acid, threonine, serine, proline, glutamic acid, glycine, alanine, valine, cysteine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, lysine, histidine and arginine. A "rare" amino acid was not identified. Tryptophane was not present (basic secretion hydrolysis). The quantitative determination of free amino acids, based on the total content, showed the following results: glycine (40.9%), glutamic acid (10.8%), aspartic acid (2.65%), lysine (1.3%).

This result shows, that the secretion is stored in a watery glycine/glutaminic acid buffer in the oral papillae of *Peripatopsis moseleyi*.

High voltage paper electrophoreses and gel filtration experiments with dextran and agarose gels showed, that the secretion protein consists of, at least, two fractions with different molecular weight.

Einleitung

Onychophoren (Stummelfüßer) stehen stammesgeschichtlich weit entfernt von den Diplopoden. Sie bilden neben Arthropoden, Anneliden und einigen kleineren Stämmen einen eigenen Stamm innerhalb der Stammgruppe Articulata. Ihr Vorkommen ist auf die Südkontinente beschränkt¹. Es ist ungewiß, ob Diplopoden und Onychophoren einen gemeinsamen Vorläufer in der Evolution, etwa einen „ancestralen Arthropoden“ haben, oder ob sie aus verschiedenen Wurzeln entstanden sind. Onychophoren, z. B. *Peripatopsis moseleyi* (Abb. 1)** speichert ein Sekret in Oralpapillen (= umgewandelte Extremitäten), die am Kopf lokalisiert sind.

Das farblose und geruchlose Sekret wird als Flüssigkeit aus den Oralpapillen herausgeschleudert, wenn die Tiere erschreckt oder in grelles Licht ge-

stellt werden. An der Luft erstarrt es sofort, meistens in Form vieler feiner und elastisch klebriger Fäden.

Über die chemische Natur dieses Sekretes sind nur wenige, mehr allgemeine qualitative Hinweise, wie Lösungsverhalten in Wasser und organischen Lösungsmitteln, pH-Wert, Auftreten von Opaleszenz, positive Reaktion mit Millon's-Reagenz, beim Xanthoprotein-, Schwefel-, Biuret-Test, beim Aldehyd-Test auf Tryptophan, sowie negative Reaktion beim Molisch-Test auf Zucker, publiziert².

Eisner und Meinwald vermuten³, daß die Wirkung des Sekretes mehr mechanischer Art – „Verkleben“ der Angreifer – als toxischer Art ist und bringen das Sekret von „Peripatus“ auf Grund seiner phänomenologischen Ähnlichkeit mit dem von *Glomeris marginata*⁴ (Diplopoda) in Beziehung.

Eine Ähnlichkeit auf Grund phylogenetischer Verwandtschaft ist jedoch auszuschließen.

Zoologische Studien an Onychophoren – Physiologie, Lokomotion, Entwicklung, Verhalten – wurden von Holliday unternommen^{5, 6}.

Onychophoren sind Fleischfresser, während Diplopoden sich fast ausschließlich von Pflanzen er-

* Ergebnisse aus der Dissertation, Hamburg 1974.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Harald Röper, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität, Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13.

** Abb. 1 siehe Tafel auf Seite 56 b.



nähren. Hierin zeigt sich ein weiterer Unterschied zwischen Onychophoren und Diplopoden.

Eigene analytische Untersuchungen sollten einen weiteren Beitrag über die chemische Zusammensetzung dieses interessanten Wehrsekretes liefern.

Neben der quantitativen Bestimmung von Aminosäuren aus Sekret-Hydrolysaten und der Bestimmung freier, d. h. nicht Protein gebundener Aminosäuren, sollten der Wasseranteil, flüchtige organische Sekret-Komponenten, sowie Kohlenhydrate bestimmt werden.

Außerdem sollte mit Hilfe der Papierelektrophorese und der Gelchromatographie versucht werden, das Sekret-Protein auf molekulare Einheitlichkeit zu überprüfen.

Materialien und Methoden

a) Tiermaterial

40 Onychophoren (Stummelfüßer) *Peripatopsis moseleyi* konnten aus Natal (Südafrika) beschafft und auch dort bestimmt werden.

Die Tiere wurden in Glaskästen (25 cm × 17 cm × 21 cm) bei ca. 20 °C in Gefangenschaft gehalten. Sie lebten in ihrem natürlichen Biotop vom Fundort [modernes Holz] bei mäßiger Feuchtigkeit.

Die Tiere wurden mit frisch zerquetschten Mehlwürmern ernährt. Unter diesen Bedingungen konnten alle Tiere vier Wochen lang in Gefangenschaft überleben.

Die Epidermis der zur Verfügung stehenden Onychophoren war von grüner, dunkel-blauer oder rost-brauner Farbe.

b) Sammeln des Sekretes

Ein Exemplar *P. moseleyi* wurde schnell am Hinterleib hochgehoben und mit der Vorderpartie (Kopf und Oralpapillen) in ein Präparateglas gehalten. Augenblicklich wurde mehrmals hintereinander unter Kontraktion des gesamten Körpers das schleimige, weiß durchscheinende Sekret – teilweise unter Bildung feiner Fäden – in das Glas geschleudert, wo es an den Innenwandungen nach wenigen Minuten zu einer milchig klebrigen und bläulich weiß opaleszierenden zähen Masse erstarrte.

Sekrete verschieden farbiger Exemplare wurden in Präparategläser eingewogen und getrennt untersucht. Im Mittel betrug die Sekretmenge 38 mg/Tier.

c) Dünnschichtchromatographie

Auf die Gegenwart von Kohlenhydraten wurde dünnschichtchromatographisch geprüft. DC-Alufo-

lien mit Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fa. Merck). Laufmittel: Chloroform : Methanol : NH₄OH = 2:1:1 (v/v/v) [obere Phase]. *n*-Butanol : Wasser : Pyridin : Eisessig = 5:5:3:2 (v/v/v/v). Sprühreagenz: 0,3% Naphtoresorcin in Äthanol. Im Verhältnis 1:1 mischen mit 2 N H₂SO₄.

d) Bestimmung des Wassergehaltes

Die eingewogenen Sekretproben wurden im Exsiccator über (P₂O₅)₂ getrocknet. Der Wassergehalt (%) ergibt sich aus der Gewichts Differenz.

e) GC-Untersuchungen

Zur Prüfung auf die Gegenwart flüchtiger Sekretbestandteile wurde eine Sekretprobe (70,3 mg) mit 1 ml p. a. Diäthyläther ausgezogen und 1 µl gaschromatographisch untersucht.

Gaschromatograph Modell F 20 (Fa. Perkin-Elmer) mit FID. 2 m gepackte Glassäule (XE 60 2,5% auf Chromosorb G AW DMCS 80/100 mesh). Arbeitstemperatur: 50 °C. Trägergasströmung [nachgereinigter Stickstoff]: 25 ml/min. Höchste Detektorempfindlichkeit.

f) Aminosäureanalysen

Zur sauren Sekret-Hydrolyse wurde über (P₂O₅)₂ getrocknetes und ausgewogenes Sekret-Protein in einem dickwandigen, abgeschmolzenen Reagenzglas mit 5 ml halbkonzentrierter Salzsäure bei 130 °C 24 Stunden lang hydrolysiert. Der Inhalt wurde zur Entfernung der Salzsäure mehrmals mit Wasser an der Ölpumpe abgezogen. Die Rückstände wurden mit 0,2 N Citrapuffer pH 3.25 in 5 ml geeichte Meßkolben überführt.

Aliquote Volumina wurden für die quantitative Aminosäureanalyse verwendet.

Zur basischen Sekret-Hydrolyse [Bestimmung von Tryptophan] wurde getrocknetes und ausgewogenes Sekret-Protein mit 0,3 N Ba(OH)₂-Lösung bei 140 °C 48 Stunden lang in einem dickwandigen abgeschmolzenen Reagenzglas aufgeschlossen.

Ba²⁺-Ionen wurden durch Einleiten von CO₂ als Carbonat gefällt und abzentrifugiert.

Die Überstände wurden abgenommen, im Ölpumpenvakuum zur Trockne eingeengt und mit 0,2 N Citrapuffer pH 3,25 in 5 ml geeichte Meßkolben überführt. Je 1 ml dieser Lösungen wurde analysiert.

Zur Bestimmung des Gehaltes an freien Aminosäuren im Sekret-Protein wurden die getrockneten und ausgewogenen Sekret-Proben direkt auf die Ionenaustauschersäule des Analysators aufgetragen, getrennt und quantitativ bestimmt.

Die quantitativen Aminosäureanalysen wurden an einem automatischen Aminosäureanalysator Modell 120 B (Fa. Beckman) durchgeführt. Säule: 60 cm lang, ϕ : 0,9 cm. Harz: Typ 50 B (Fa. Beckman). Pufferlösungen: Natriumcitratpuffer. Pufferwechsel: pH 2,85/4,82, Normalität: 0,15/0,8, Zeit: 7,5 Stunden. Temperaturwechsel: 33,5 – 70 °C, Zeit: 4,5 Stunden. Durchfluß: Puffer (40 ml/Stunde), Ninhydrin-Lösung (20 ml/Stunde). Vor jeder Aminosäureanalyse wurde ein Eichchromatogramm aufgenommen. Die Peakflächen wurden mit einem elektronischen Integrator Modell CRS-100 AU 12 (Fa. Infotronics Corp.) gemessen.

g) Elektrophorese

Zur Untersuchung auf molekulare Einheitlichkeit des Sekret-Proteins wurden Hopspannungslektrophoresen auf Papier an einem Gerät vom Typ Phorograph-Original, Frankfurt, durchgeführt. Papier: Typ 261 (schnell) 40 × 20 cm (Fa. Macherey und Nagel). Elektrophorese-Puffer: Pyridiniumacetat-Puffer pH 3,5. 100 ml Eisessig und 10 ml Pyridin p. a. werden mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Arbeitsbedingungen: U: 2400 V, I: 60 mA (90 min). Anfärbung: 1% Coomassie-Brillantblau R 250 in destilliertem Wasser.

h) Gelfiltrationsexperimente

Alle Versuche wurden an einem Chromatographierohr Typ K 25/45 (Fa. Pharmacia) (Länge: 45 cm, ϕ : 2,5 cm) mit Durchflußadaptoren durchgeführt.

An folgenden Dextran- und Agarose-Gelen, die einen Fraktionierbereich von Molekulargewicht 1500 – 40 × 10⁶ abdecken, wurden Trennversuche durchgeführt: Sephadex G 50 (fine), Sephadex G 100 (normal), Sephadex G 200 (superfine), Sepharose 6B, Sepharose 4B, Sepharose 2B (Fa. Pharmacia). Eluiert wurde mit einem von Porath⁷ beschriebenen, flüchtigem 0,1 M Triäthylammoniumacetat-Puffer mit pH 4,1 (J: 0,2).

0,1 mol (10,2 g) frisch destilliertes Triäthylamin wird mit 950 ml destilliertem Wasser versetzt und mit 0,3 mol (18 g) Eisessig auf pH 4,1 eingestellt (Glaselektrode). Dann wird mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Zur Vermeidung von Adsorptionseffekten aromatischer Aminosäuren im Sekret-Protein an der Gelmatrix wurde dem Puffer 0,001 mol des Detergenzes Natriumdodecylhydrogensulfat (SDS) zugesetzt. Gegen mikrobiellen Befall der Gele wurde dem Puffer außerdem 0,02% Natriumazid zugesetzt. Das gewählte Puffersystem zeigte folgende Eigenschaften:

Das Sekret-Protein ist in diesem Puffer vollständig löslich. Der Puffer zeigt bei 280 nm keine Eigenabsorption. Bei dieser Wellenlänge werden eluierende Proteinfractionen (Absorption durch aromatische Aminosäuren) mit Hilfe eines UV-Durchflußphotometers gemessen. Der Puffer läßt sich vollständig im Ölpumpenvakuum oder durch Gefrier-trocknung von den Protein-Fractionen entfernen.

UV-Durchflußphotometer Typ Uvicord II (Fa. LKB) [Messung bei 280 nm]. Die Ausschlußvolumina (V_0) der gepackten Gele wurden mit einer 0,2% Detranblau 2000-Lösung in dem beschriebenen Puffer bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Das Wehrsekret von *P. moseleyi* enthält weder flüchtige organische Bestandteile noch Kohlenhydrate. Der Wassergehalt beträgt 84%. Die Wehrsekrete verschieden-farbiger Exemplare von *P. moseleyi* zeigen in ihrer Aminosäurezusammensetzung weder qualitative noch quantitative Unterschiede.

Aus dem salzsauren Sekrethydrolysat wurden folgende Aminosäuren quantitativ bestimmt (μ mol Aminosäure/1 mg Trockensubstanz): Asp (0,942), Thr (0,350), Ser (0,241), Pro (0,584), Glu (0,722), Gly (1,547), Ala (0,159), Val (0,392), Cys (0,050), Met (0,101), Ileu (0,360), Leu (0,356), Tyr (0,281), Phe (0,328), Lys (0,688), His (0,177), Arg (0,310). Eine „seltene“ Aminosäure (<0,05) konnte nicht zugeordnet werden. Tryptophan ist in dem Sekret-Protein nicht vorhanden.

Die Bestimmung freier, also nicht im Proteinverband gebundener Aminosäuren ergibt folgendes Ergebnis (μ mol Aminosäure/1 mg Trockensubstanz): Asp (0,025), Glu (0,078), Gly (0,632), Lys (0,009).

Bezogen auf den Gesamtgehalt der betreffenden Aminosäure im Sekret ergeben sich folgende Werte an freien Aminosäuren: Asp (2,65%), Glu (10,8%), Gly (40,9%), Lys (1,31%).

Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis auf die Speicherform des Wehrsekretes. Das Sekret wird in einem wäßrigen Glycin/Glutaminsäurepuffer in den Oralpapillen von *P. moseleyi* gespeichert.

Bei der Abwehrreaktion wird diese Lösung verspritzt. Beim Kontakt mit der Luft wird das Sekretprotein, wahrscheinlich unter Ausbildung von Disulfid-Brücken zwischen Cystein-Bausteinen, denatu-

riert und bildet zunehmend viskose und klebrige Fäden. Die elastischen Eigenschaften dieser Sekret-Fäden deuten auf eine micelläre Struktur hin. Dies wurde inzwischen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt⁸.

Versuche zur weiteren Fraktionierung des Sekret-Proteins mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese und der Gelchromatographie zeigen qualitativ ähnliche Ergebnisse:

Durch Hochspannungspapierlektrophorese ließ sich das Sekret-Protein in zwei mit Coomassie-Brillantblau R 250-Lösung anfärbbare Zonen mit R_F -Werten von 0,00 und 0,25 auftrennen. Ein Teil des Proteins verbleibt am Start, der andere ist in Richtung Kathode gewandert.

Die Gelfiltrations-Experimente ergaben folgendes Resultat: Auf allen verwendeten Dextran-Gelen (Sephadex-Typen), die einen Fraktionierungsbereich von 1500–800 000 für globuläre Proteine abdecken, wurde das gesamte Sekret-Protein mit dem Ausschlußvolumen (V_0) eluiert.

An Agarose-Gelen (Sepharose-Typen) wurde das Sekret-Protein in 2 Fraktionen getrennt. Dabei wurden folgende K_{av} -Werte ermittelt: Sepharose 6 B

(Ausschlußgrenze für globuläre Proteine 4×10^6): $K_{av} = 0$, $K_{av} = 0,76$; Sepharose 4 B (Ausschlußgrenze für globuläre Proteine 20×10^6): $K_{av} = 0$, $K_{av} = 0,97$; Sepharose 2 B (Ausschlußgrenze für globuläre Proteine 40×10^6): $K_{av} = 0$, $K_{av} = 1,0$. Alle Versuche zur weiteren Fraktionierung des Sekret-Proteins lassen qualitativ den Schluß zu, daß dieses aus mindestens zwei Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichtes besteht.

Eine Aussage über deren Molekulargewichte mit Hilfe der Gelchromatographie (K_{av}/\log MG-Diagramm) könnte nur mit Hilfe von Eichproteinen ähnlicher Struktur und bekannten Molekulargewichtes gemacht werden. Eine Überprüfung der Ergebnisse, besonders im Hinblick auf die hochmolekulare Sekretkomponente, müßte in jedem Fall durch Molekulargewichtsbestimmungen an der Ultrazentrifuge erfolgen.

Herrn Dr. Bruno J. Lamoral, Natal Museum, Pietermaritzburg (Südafrika) danke ich für das Sammeln und die Bestimmung der Onychophoren. Herrn Prof. Dr. Kurt Heyns und Herrn Prof. Dr. Otto Kraus danke ich für wertvolle Diskussionen.

¹ A. Kaestner, Lehrbuch der speziellen Zoologie, Teil I (Wirbellose), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1963, S. 450.

² Heatley, berichtet von S. M. Manton, Phil. Trans. R. Soc. (London), Serie B, **227**, 411–464 [1937].

³ T. Eisner u. J. Meinwald, Science **153**, 1341 [1966].

⁴ H. Schildknecht, W. F. Wenneis, K. H. Weiss u. U. Maschwitz, Z. Naturforsch. **21b**, 121 [1966].

⁵ R. A. Holliday, Ann. Natal Museum **10**, 237 [1942].

⁶ R. A. Holliday, Ann. Natal Museum **10**, 433 [1944].

⁷ J. Porath, Nature **175**, 478 [1955].

⁸ H. Ruhberg u. V. Storch, Zool. Anzeiger (im Druck).

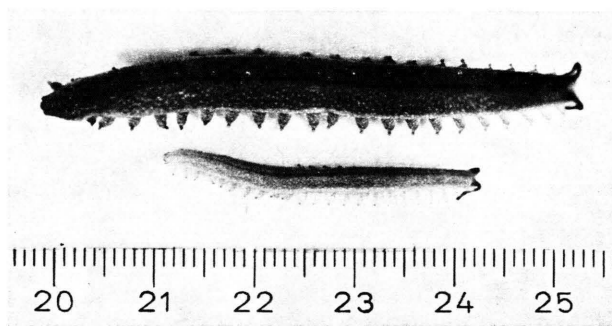


Abb. 1. *Peripatopsis moseleyi* (Onychophora).