

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Aus der Zoologischen Station in Neapel
und aus dem Institut für Meereskunde an der Universität Kiel

Reinigung zweier krabbenlähmender Toxine aus der Seeanemone *Anemonia sulcata*¹⁾

Von LÁSZLO BÉRESS und ROSEMARIE BÉRESS

Zusammenfassung: In der Seeanemone *Anemonia sulcata* wurden zwei krabbenlähmende Toxine (I und II) nachgewiesen und partiell gereinigt. Es wurde gezeigt, daß es sich dabei um wasserlösliche, in saurer und neutraler Lösung recht hitzestabile Polypeptide handelt. Diese Neurotoxine kommen nicht nur in den Tentakeln, sondern auch im Anemonenkörper in annähernd gleicher Konzentration vor. Zur Extraktion der Toxine aus den zerkleinerten Seeanemonen wurde warmer 50%iger Äthanol verwendet. Die weitere Reinigung erfolgte durch fraktionierte Alkohol- und Acetonfällung, Kationenaustauscherchromatographie und Gelfiltration. Die Reinheit wurde mit der Stärkegel- und Polyacrylamidgelelektrophorese geprüft. Die letale Dosis für Krabben liegt bei Toxin I unter 30 µg/kg *Carcinus maenas* und bei Toxin II unter 7 µg/kg. Auch an Warmblütern wurde eine stark krampfauslösende Wirkung der Toxine festgestellt. Das Molekulargewicht der toxischen Polypeptide liegt in der Größenordnung von 5000 bis 10000. Es wurde gezeigt, daß für die krabbenparalysierende Wirkung ausschließlich Polypeptidtoxine verantwortlich sind.

Purification of two crab paralysing toxins from the sea anemone *Anemonia sulcata* (Summary): Two crab paralysing toxins (I and II) were found in the sea anemone *Anemonia sulcata* and were partially purified. These toxins are polypeptides, that are watersoluble and rather heatresistent in acidic and neutral solution. Toxicity was found in tentacles and bodies in similar concentration. For the extraction of the toxins from the homogenised *Anemonia sulcata* warm 50% ethanol was used. Further means for purification were fractionated precipitation with ethanol and acetone, kationexchangechromatography and gelfiltration. Purity was tested with starchgel- and polyacrylamidgel electrophoresis. The lethal dose for crabs is less than 30 µg/kg for Toxin I and less than 7 µg/kg for Toxin II. The toxins showed also a strong paralysing effect on mammals. The molecular weight of the toxic polypeptides lies between 5000 and 10000. It was shown that only polypeptide toxins were responsible for the crabparalysing effect.

I. Einleitung

Die auch Wachsrose genannte *Anemonia sulcata* PENNANT (Abb. 1) ist eine der im Mittelmeer am häufigsten vorkommenden Seeanemonen. Wie viele andere Coelenteraten besitzt sie hochwirksame Giftstoffe, mit denen sie ihre Beute lähmt. Die toxische Wirkung von wäßrigen und alkoholischen Tentakelextrakten an Hunden wurde schon im Jahre 1902 von RICHET entdeckt und von ihm weiterverfolgt. Er isolierte zwei Substanzen mit pruritogener bzw. krampfauslösender Wirkung, die er Thalassin bzw. Congestin nannte (RICHET 1902, 1903 a, 1903 b, 1905). Die paralysierende Wirkung der Anemonenextrakte an Krabben wurde bald danach erforscht (PERRET 1907). Diese Wirkung wurde später zeitweilig dem in den Seeanemonen enthaltenen Tetramin (Tetramethylammoniumhydroxyd) zugeschrieben (WELSH 1956; GHIRETTI 1964), obwohl auf eine nicht dialysierbare höhermolekulare, mit Trichloressigsäure jedoch nicht inaktivierbare Substanz als krabbenparalysierendes Prinzip schon viel früher hingewiesen wurde (CANTACUZÈNE u. DAMBOVICEANU 1934). Ein toxisches Polypeptid aus der *Anemonia*

¹⁾ Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst und der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die Unterstützung gedankt. Für die Korrektur des Manuskriptes danken wir Herrn Professor Dr. Klaus Krisch und Herrn Professor Dr. Carl Schlieper.

sulcata wurde erstmals von SONDERHOFF (1936) angereichert. Der starke neurotoxische Effekt der Seeanemonengifte wurde in neueren Arbeiten auf toxische Proteine zurückgeführt (WELSH 1961; WELSH u. PROCK 1958; LANE 1960, 1961; LANE u. DODGE 1958; MARTIN 1963; MATHIAS, ROSS u. SCHACHTER 1960). Die erstmalige Isolierung eines echten krabbenlähmenden Neurotoxins gelang SHAPIRO (1968). Er erhielt aus der Seeanemone *Condylactis gigantea* ein toxisches Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 10000 bis 15000.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Toxine der *Anemonia sulcata* zu isolieren und ihre chemische Natur zu klären.

II. Material und Methoden

1. Ausgangsmaterial

Die benötigten *Anemonia sulcata* wurden in der Bucht von Neapel gesammelt und an der dortigen Meeresforschungsstation aufgearbeitet. Die frisch gesammelten Tiere wurden nach der Säuberung entweder gleich verarbeitet oder bei -20°C bis zur Aufarbeitung eingefroren.

2. Biologischer Test

Die Toxizitätsteste wurden an der Strandkrabbe *Carcinus maenas* durchgeführt. Nach intramuskulärer Injektion (siehe unten) genügend hoher Dosen, wie etwa 0,1 ml eines 1%igen wäßrigen Anemonenextraktes für eine 10 g schwere Krabbe, tritt schon binnen Sekunden Muskelzittern der Extremitäten auf, die Bewegungen des Tieres werden unkoordiniert, es treten eine Reihe von Krampfanfällen auf und schließlich tritt unter Kontraktion der Extremitäten eine vollständige Lähmung und der Tod des Tieres ein. Da der Tod der Krabben zeitlich genau nicht feststellbar war, diente der Beginn der gut beobachtbaren Muskelkrämpfe als Indikator der Toxinwirkung. Einer Carcinus-einheit (CE) wurde diejenige Toxinmenge gleichgesetzt, die noch in der Lage war, binnen 5 Minuten eine 10 g schwere *Carcinus maenas* bei intramuskulärer Verabreichung des Toxins zu Krämpfen der Extremitäten zu veranlassen. Den Krabben wurden jeweils 0,1 ml Toxinlösung pro 10 g Körpergewicht durch die Gelenkhaut an der Basis des vorletzten Schreitbeines in den Muskel injiziert. Das Gewicht der zum Test verwendeten Krabben schwankte zwischen 6 und 14 g. Zur Feststellung der kleinstwirksamen Mengen wurden geometrische Verdünnungsreihen der Toxinlösungen in filtriertem Meerwasser hergestellt.

3. Isolierung

a. Extraktion. Das krabbenlähmende Toxin der *Anemonia sulcata* erwies sich als recht hitzestabil. Bei kurzem Aufkochen eines etwa 1%igen Anemonenextraktes, wobei eine Hitzedenaturierung labiler Proteine eintritt, blieb die Toxizität dieser Lösung unverändert. So konnte das alkoholische Extraktionsverfahren von SONDERHOFF (1936) in folgender modifizierter Form angewendet werden:

1 kg meerwasserfeuchte *Anemonia sulcata* wird mit 1 l 95%igem Äthanol versetzt und 1 Minute lang im Starmix homogenisiert. Das schmutzigebraune Homogenat wird unter Rühren 5 Minuten lang auf 70°C erwärmt und gleich darauf noch warm abzentrifugiert. Der klare rotbraune toxinhaltige Überstand wird abdekantiert, der grüne Rückstand noch zweimal auf die gleiche Weise mit der seinem Gewicht entsprechenden Menge 50%igem wäßrigen Äthanol nachextrahiert. Schließlich wird der Rückstand noch einmal mit der gleichen Menge destilliertem Wasser nachextrahiert. Die vereinigten Überstände werden unter Vakuum im Rotationsverdampfer bei einer Außenbad-

temperatur von 70°C auf etwa 300 ml eingengt. (Das Gefriertrocknen dieses Konzentrates ergibt etwa 70 g braunes toxisches Trockenmaterial.)

b. Herstellung von Rohtoxin. Zur Anreicherung des Anemonentoxins wurde die folgende präparative Darstellungsmethode ausgearbeitet:

Der aus 1 kg *Anemonia sulcata* erhaltene, auf ca. 300 ml eingengte alkoholische Anemonenextrakt wird gegen zweimal 10 l destilliertes Wasser dialysiert, um die Hauptmenge der Salze und der sonstigen kleinmolekularen Bestandteile zu entfernen. Anschließend wird der braungefärbte stark toxische Schlauchinhalt mit dem gleichen Volumen 95%igem Äthanol verrührt und eine halbe Stunde lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die durch die Alkoholzugabe entstandene Fällung wird abzentrifugiert, der toxinhaltige Überstand abdekantiert und aufbewahrt. Die Rückstände werden vereinigt, noch zweimal mit je 150 ml 50%igem Äthanol nachextrahiert und dann verworfen. Die Überstände werden zur Weiterverarbeitung vereinigt. Man engt die Überstände im Vakuum auf 50 ml ein, und fällt dann das Toxin aus dieser Lösung durch Zugabe von 50 ml abs. Äthanol, 300 ml Aceton und 100 ml Äther aus. Die zähflüssige braungelbe Fällung wird nach 12stündigem Stehen bei 4°C durch Abdekantieren des Überstandes abgetrennt und von Fällungsmittelresten im Vakuumexsiccator befreit. Die Toxinfällung wird nun in 50 ml destilliertem Wasser aufgenommen und gegen 20 l destilliertes Wasser 12 Stunden dialysiert (s. S. 124). Anschließend wird der Schlauchinhalt in einem Stahlbecher schnell auf 90°C erhitzt, sofort danach auf 4°C abgekühlt und 1 Stunde stehengelassen. Nach Abzentrifugieren der flockigen Niederschläge wird die Toxinlösung gefriergetrocknet. Man erhält so aus 1 kg *Anemonia sulcata* im Durchschnitt 3 g Trockenprodukt, das als Rohtoxin der *Anemonia sulcata* bezeichnet wurde.

c. Weitere Reinigung des Rohtoxins. Die Auftrennung des Rohtoxins in mehrere Fraktionen erfolgte mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie an CM-Sephadex C 50. Die Toxinfraktionen wurden mit Gelfiltration an Sephadex G 50 weitergereinigt. Zu den chromatographischen Trennungen wurde der Fraktionensammler Ultro-Rac^R und das UV-Spektralphotometer Uvicord^R mit Schreiber als Hilfsgerät verwendet. Die Transmission der Fraktionen wurde bei 280 nm gemessen. Nähere experimentelle Bedingungen zur Toxinreinigung sind aus Abb. 6, Abb. 7a und Abb. 7b zu ersehen.

d. Reinheitsprüfung. Die Reinheit der Toxinfraktionen wurde mit der Stärkegelelektrophorese und mit der Polyacrylamidgelelektrophorese geprüft (Abb. 5 und Abb. 8).

e. Die Schätzung der Molekulargewichte erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex G 50. Als Eichsubstanz diente der Proteinaseinhibitor Trasylol^R (Bayer Lev.) aus der Rinderlunge.

f. Die Proteinwerte wurden mit der Biuretmethode ermittelt.

III. Ergebnisse

1. Vorversuche

Als erstes wurden Versuche zur Ermittlung der Lokalisierung des Toxins im Tier angestellt. Wäßrige Extrakte¹⁾ von lyophilisierten Tentakeln, Körpern, Filamenten und Randbläschen der *Anemonia sulcata* wurden vergleichend an *Carcinus maenas* getestet:

¹⁾ Herstellung der wässrigen Extrakte: Je 1 g lyophilisiertes Material wurde mit 100 ml destilliertem Wasser 30 sec. lang homogenisiert und bei 10000 RPM 15 Min. lang abzentrifugiert.

Tabelle 1
Vergleichende Zusammenstellung der Toxizitäten von vier verschiedenen Gewebeteilen der *Anemonia sulcata*

	Protein mg/ml	Spez. Tox. CE/mg Probe	Spez. Tox. CE/mg Prot.
Tentakel	2,7	16	5,9
Körper	6,0	32	5,3
Filamente	0,9	16	17,7
Randbläschen	2,5	128	51,2

Wie man aus Tabelle 1 ersieht, ist das Toxin nicht auf die Tentakel beschränkt, sondern scheint fast im gleichen Verhältnis zwischen Körper und Tentakel verteilt zu sein. Auch die Mesenterialfilamente enthalten Toxine in beträchtlicher Konzentration. Die höchste spezifische Aktivität wurde überraschenderweise in den Randbläschen gefunden, die jedoch wegen ihrer geringen Menge für die Toxinisolierung nicht in Betracht kamen. Da demnach Toxin in allen untersuchten Geweben vorkommt, wurden zur Toxingewinnung die ganzen Tiere benutzt (s. S. 118).

2. Toxizitätsbilanz bis zur Darstellung des Rohtoxins.

Zu den Toxizitätsbestimmungen wurden immer die wäßrigen Extrakte lyophilisierter Proben getestet.

Nach Gefriertrocknung erhält man aus 1 kg feuchter *Anemonia sulcata* durchschnittlich 130 g Trockenmaterial mit einer spezifischen Toxizität von 24 CE/mg Subst., was einer Gesamttoxizität von 3 120 000 CE entspricht. Mit der warmen alkoholischen Extraktionsmethode erhält man aus der gleichen Menge *Anemonia sulcata* etwa 70 g Trockensubstanz mit einer spezifischen Toxizität von 32 CE/mg (Gesamttoxizität 2 240 000 CE). Die Ausbeute an Rohtoxin aus 1 kg feuchter *Anemonia sulcata* beträgt etwa 3 g Substanz mit einer spezifischen Toxizität von 512 CE/mg (Gesamttoxizität 1 536 000 CE). Die Toxizitätsausbeute von den rohen Anemonen bis zum Rohtoxin beträgt also 49% bei einer 21fachen spezifischen Anreicherung.

3. Wirkung des Rohtoxins bei Warmblütern und Fröschen.

Das trockene leicht pulverisierte Rohtoxin reizt nach dem Einatmen stark die Schleimhäute und löst Nießen aus. Es schmeckt bitter. Intravenöse Verabreichung von 10 mg Rohtoxin ruft bei einem narkotisierten Kaninchen schon 30 Sekunden nach der Injektion schwere Krampfstände hervor, die binnen 15 Minuten zum Tode des Tieres

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 1)

Abb. 1: *Anemonia sulcata* PENNANT

Abb. 3: Hemmung der Fibrinabbaufähigkeit des Trypsins durch eine wäßrige Rohtoxinlösung (nach BIEL et al. 1964)

Obere Reihe: Humanplacentaextrakt; 1%ige wäßrige Lösung

Mittelrinne: gefüllt mit 0,01% Trypsinlösung

Untere Reihe: Rohtoxin; 1%ige wäßrige Lösung

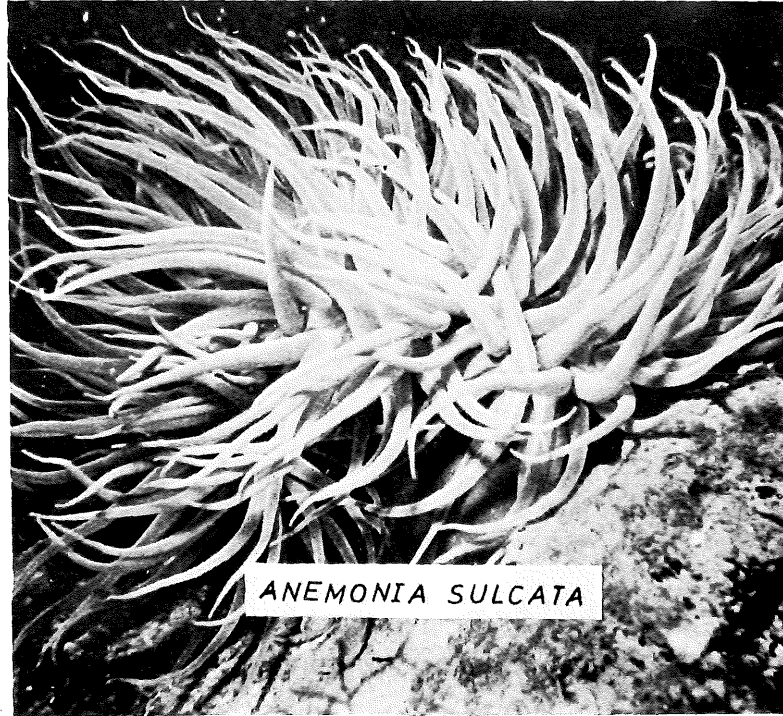
Verdünnung von links nach rechts: 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16

Abb. 5: Auftrennung des Rohtoxins mittels Stärkegelelektrophorese

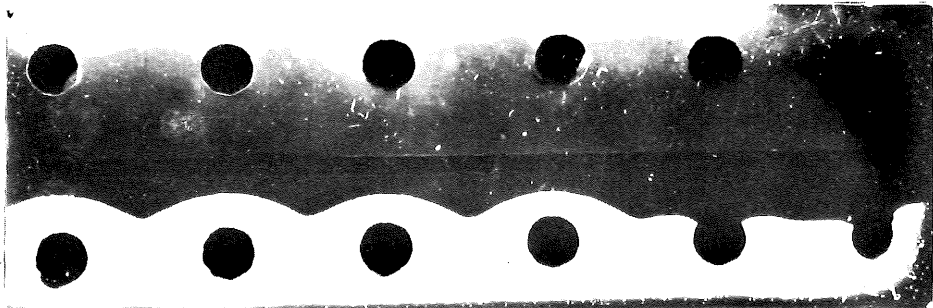
Gelpuffer: Veronalpuffer pH 8,6. Feldstärke : 8 V/cm

Laufzeit: 20 Stunden. Temperatur 4° C

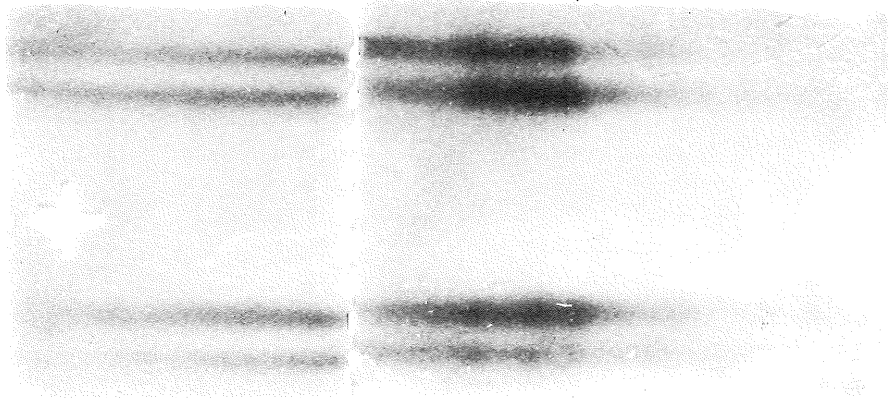
Anfärbung: Amidoschwarz 10B



①

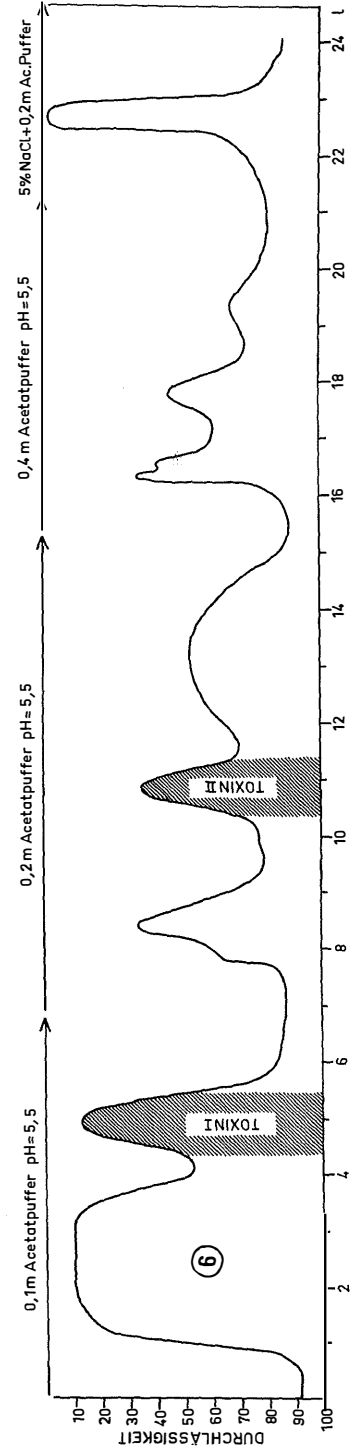
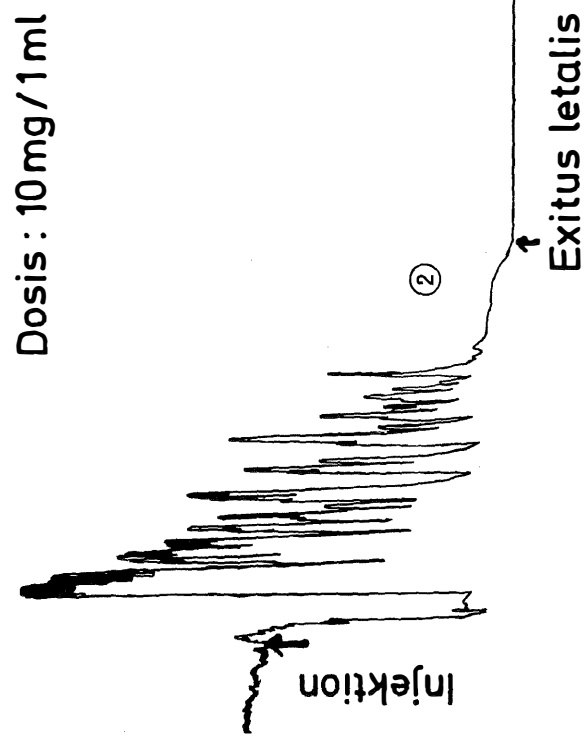
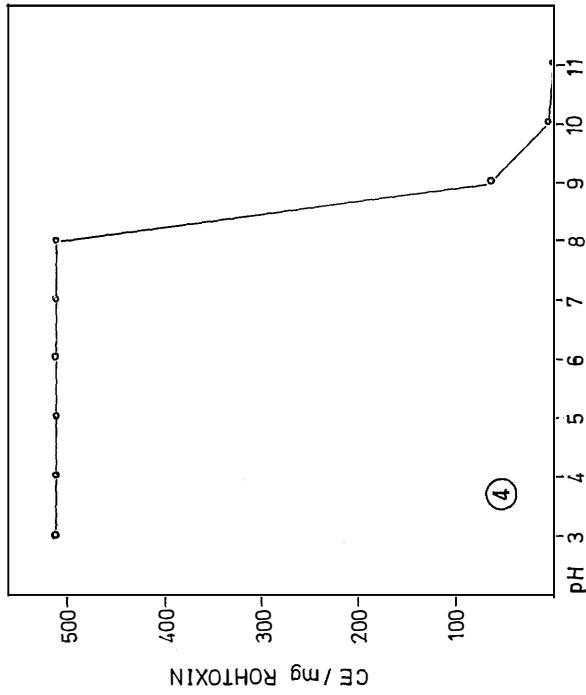


③



⑤

Tafel 1 (zu L. u. R. Béress)



Tafel 2 (zu L. u. R. Béress)

führen. Es kommt dabei zunächst zu starken Blutdruckschwankungen und anschließend zu einem Abfall des Blutdruckes bis zum Tod des Tieres (Abb. 2).

Auch an Mäusen konnten Krampfstände mit anschließender Lähmung nach intravenösen Toxingaben beobachtet werden. Die LD_{50} ist 100 μ g Rohtoxin/20 g Maus.

Auf die hohe Toxizität des Rohtoxins gegenüber *Carcinus maenas* wurde schon auf S. 120 hingewiesen.

Überraschenderweise zeigte sich der Grasfrosch *Rana temporaria* dem Rohtoxin gegenüber recht unempfindlich. Bei Injektionen von je 3 mg Rohtoxin in drei 20–23 g schwere Grasfrösche konnten nur starke Unruhe und erst nach 30 Minuten beginnende Krämpfe beobachtet werden. Die Tiere lebten noch nach drei Stunden. Das Verhalten der *Rana temporaria* dem Rohtoxin gegenüber war im Vergleich zu Kaninchen, Mäusen und Krabben untypisch. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von SONDERHOFF (1936), der eine sehr hohe Empfindlichkeit der *Rana temporaria* gegen das Toxin der *Anemonia sulcata* festgestellt hatte.

4. Enzymhemmversuche

Eine käufliche Acetylcholinesterase aus Rindererythrocyten wurde durch Konzentrationen von 10 mg Rohtoxin pro 20 ml Ansatz nicht gehemmt, so daß der Wirkungsmechanismus des Toxins nicht auf eine Acetylcholinesterasehemmung zurückgeführt werden kann (KRISCH 1968).

Trypsin wird vom Rohtoxin stark gehemmt. Für die Trypsinhemmung sind jedoch nicht die Toxine, sondern im Rohtoxinkomplex noch vorhandene Proteinaseinhibitoren verantwortlich. Der qualitative Antitrypsinnachweis (Abb. 3) wurde mit der Fibrinagarplattenmethode nach BIEL et al. (1964), die quantitativen Trypsinhemmteste wurden nach ERLANGER et al. (1961) durchgeführt.

5. Eigenschaften des Rohtoxins

Das Rohtoxin ist in schwach saurer und neutraler Lösung bei fünfminütigem Erhitzen im Wasserbad auf 100°C absolut stabil, im alkalischen Milieu wird es jedoch bei Erhitzen ab pH 9 weitgehend und ab pH 10 praktisch restlos inaktiviert (Abb. 4).

6. Hinweis auf den Polypeptidcharakter

Das UV-Spektrum des Rohtoxins mit einem Absorptionsmaximum bei 278 nm, sein Stickstoffgehalt (Gesamt-N 13,5%), seine gute Wasserlöslichkeit weisen auf ein Polypeptid bzw. Polypeptidgemisch mit Tyrosin- und Tryptophanmolekülen hin. Auch die Biuret- und Ninhydrinreaktion mit dem Rohtoxin waren positiv. Mittels der Stärkegelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß es sich hier um eine Mischung von verschiedenen polypeptidartigen Verbindungen handelt (Abb. 5). Bei wiederholten Elutionen aus den Stärkegeleschnitten mit anschließenden Toxizitätstesten wurde festgestellt,

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 2)

Abb. 2: Blutdruckschwankungen eines 3 kg schweren Kaninchens nach intravenöser Verabreichung von 10 mg Rohtoxin

Abb. 4: Inaktivierung des Rohtoxins nach fünfminütigem Erwärmen auf 100°C in Abhängigkeit vom pH. 1%ige Rohtoxinlösungen in 0,2 m Glycin/HCl bzw. Glycin/NaOH-Puffer

Abb. 6: Chromatographische Auftrennung von 15 g Rohtoxin auf CM Sephadex C 50. Stufenweise Elution mit Natriumacetatpuffer steigender Molarität. pH = 5,5 konst.
Die Stufen: 0,1 m, 0,2 m, 0,4 m und (5%ige NaCl + 0,2 m Puffer)
Dimensionen der Säule: Länge 40 cm, Durchmesser 7 cm
Arbeitstemperatur 20°C, Laufzeit 22 Std.

daß auf der kathodischen Seite die krabbenparalysierende Aktivität nachzuweisen war, was auf eine stark basische Substanz schließen ließ.

7. Weitere Reinigung des Rohtoxins

a. Ionenaustauschchromatographie: Aufgrund des obigen Befundes wurde die präparative Auftrennung des Rohtoxins mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie vorgenommen. Dazu wurde eine mit 0,1 m Acetatpuffer (pH 5,5) equilibrierte CM-Sephadex C 50 Säule verwendet.

15 g Rohtoxin wurden in 200 ml 0,1 m Acetatpuffer pH 5,5 gelöst und schubweise auf die Austauschersäule aufgetragen. Nach Einsickern der Lösung in die Säule wurde diese weiterhin mit 0,1 m Acetatpuffer, dann mit Puffern steigender Molarität eluiert (Abb. 6). Wie aus Abb. 6 zu ersehen ist, ließ sich das Rohtoxin in mehrere Fraktionen auftrennen. Anschließende Toxizitätsteste an Krabben zeigten, daß sich die krabbenparalysierende Aktivität vorwiegend auf zwei Fraktionen beschränkte; eine schwach basische Polypeptidfraktion (Abb. 6 Gipfel 2) als Toxin I bezeichnet, ließ sich schon mit 0,1 m Acetatpuffer direkt im Anschluß an die inaktiven sauren Anemonenproteine vom Austauscher eluieren, während die Elution einer weiteren, stärker basischen Toxinfraktion (Abb. 6 Gipfel 4), benannt Toxin II, erst mit 0,2 m Acetatpuffer gelang.

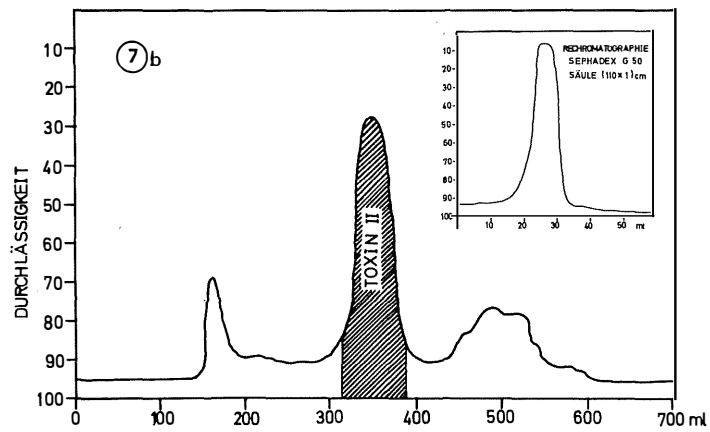
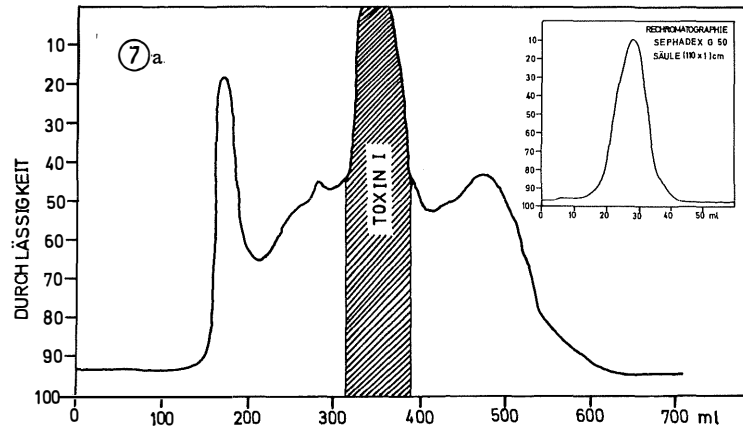
b. Gelfiltration: Die Toxine I und II, die nach der Kationenaustauschchromatographie in partiell gereinigtem Zustand vorlagen, zeichneten sich im Vorversuch, im Gegensatz zu dem nicht dialysierbaren Rohtoxin, durch langsame Dialysierbarkeit aus. Nach einer 12stündigen Dialyse der toxischen Fraktionen ließ sich nur noch etwa 15% der eingesetzten Aktivität im Schlauch nachweisen. Aus diesem Grunde mußte auf eine erschöpfende Dialyse als Zwischenschritt bei der Toxinreinigung verzichtet werden, stattdessen wurde mit Hilfe der Gelfiltrationstechnik weitergearbeitet. Es wurde vorwiegend vom Sephadex G 50 zur Weiterreinigung, und vom Sephadex G 15 zum Entsalzen Gebrauch gemacht.

Die acetatpufferhaltigen Toxinfraktionen I und II wurden nach Chromatographie an CM Sephadex C 50 (Abb. 6) in gefrorenem Zustand im Hochvakuum stark eingengt, ein Teil der Puffersalze wurde durch einstündige Dialyse aus der Lösung entfernt. Nach erneutem starken Einengen der Toxinlösungen konnten diese direkt der Gelfiltration unterworfen werden.

Es hat sich dabei gezeigt, daß Toxin I und Toxin II an einer Sephadex G 50 Säule sehr ähnliche Trennkurven ergaben (Abb. 7a u. Abb. 7b). Beide Toxine traten erst nach erheblicher Verzögerung aus der Säule aus, und dadurch konnten einige schnellwandernde hochmolekulare Begleitproteine (Abb. 7a u. 7b, Gipfel 1), die nach der CM Chromatographie noch nicht eliminiert waren, leicht von den Toxinen abgetrennt werden. Die gleichfalls mitgeschleppten niedermolekularen Verunreinigungen wurden von dem Sephadex G 50 am stärksten zurückgehalten und traten erst am Ende der Trennung aus der Säule aus (Abb. 7a u. 7b, Gipfel 3). Die gereinigten Toxinlösungen I und II (Abb. 7a u. 7b) wurden nach starkem Einengen im gefrorenen Zustand im Hochvakuum mittels Gelfiltration an Sephadex G 15 entsalzt, und nach dem Lyophilisieren erhält man die gereinigten Toxine in weißer Pulverform. Das Rechromatogra-

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 3)

Abb. 7a, 7b: Gelfiltration von Toxin I und Toxin II an Sephadex G 50
Laufmittel: 1 m NaCl + 0,1 m Tris/HCl Puffer pH 8,0
Säulendimension; Länge 90 cm, Durchmesser 2 cm
Dauer: 8 Std. Arbeitstemperatur 20° C



Tafel 3 (zu L. u. R. Béress)

PAA-GEL PH=8,6

⊕

⊕



I

II



⊖

⊖

Ⓟ

TOXIN I.

TOXIN II.

Tafel 4 (zu L. u. R. Béress)

phieren an Sephadex G 50 (Abb. 7a Kleinbild, Abb. 7b Kleinbild) hat nicht mehr wesentlich zur Weiterreinigung beigetragen.

Die krabbenparalysierende Aktivität dieser Substanzen ist unterschiedlich hoch, 3333 CE/mg Substanz für Toxin I und 14285 CE/mg Substanz für Toxin II. Wenn man von der Gesamtoxizität des zur chromatographischen Trennung eingesetzten Rohtoxins ausgeht, erhielt man mit der Toxizität beider gereinigter Toxine zusammen etwa 25% an Ausbeute.

Die gereinigten Toxinproben zeigten keine (Toxin I) bzw. stark verminderte Trypsin-
hemmung (Toxin II), ein Beweis dafür, daß die Trypsinhemmaktivität des Rohtoxins von anderen Substanzen als den Toxinen herrührt (Abb. 3).

Tabelle 2
Anreicherungs-schritte bei der Isolierung der Toxine

Toxische Substanz	Spezif. Toxizität (CE/mg Subst.)	Anreicherung	Ges. Toxizität in CE
1 kg <i>A. sulcata</i> (feucht)	—	—	—
130 g <i>A. sulcata</i> (trocken)	24	1	3 120 000
70 g Alkohol-Extrakt (trocken)	32	1,33	2 240 000
3 g Rohtoxin (trocken)	512	21	1 536 000
46 mg Toxin I	3 333	139	153 318
<u>16,12 mg Toxin II</u>	<u>14 285</u>	<u>595</u>	<u>230 274</u>
	Toxizitätsausbeute:	Toxin I = 4,9%	Toxin II = 7,4%
	Zusammen	<u>= 12,3%</u>	

8. Anreicherungs-faktor

Bei beiden Toxinen handelt es sich um Gruppen von schwach basischen bzw. stark basischen Polypeptiden, die bis auf die aus Abb. 8 ersichtliche Reinheit gebracht werden konnten. Wie daraus zu ersehen ist, konnte mit Hilfe der in dieser Arbeit angewandten Methode die völlige Reinheit beider Toxine noch nicht erreicht werden. Es gelang hier immerhin, ausgehend vom zerkleinerten Anemonengewebe, das Toxin I der *Anemonia sulcata* 139fach und das Toxin II 595fach anzureichern.

Eine Übersicht über die Anreicherungs-schritte der Toxine zeigt Tabelle 2.

9. Abschätzung des Molekulargewichtes

Schätzung über das Molekulargewicht der beiden Toxine wurden mit Hilfe der Gelfiltration angestellt. Da die beiden Toxine von der Sephadex G 50 Säule gleich stark zurückgehalten wurden (Abb. 7a u. 7b), ergab sich die Vermutung, daß es sich hier um Moleküle gleicher Größenordnung handelt. Die effektive Molekulargröße wurde ebenfalls mit Hilfe der Gelfiltration unter Verwendung einer Eichsubstanz mit bekanntem Molekulargewicht ermittelt. Dazu hat sich der Proteinaseinhibitor aus Rinderlunge

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 4)

Abb. 8: Polyacrylamidgelelektrophorese von Toxin I und Toxin II
Puffer: Tris-Boratpuffer 0,15 m. pH = 8,6
Feldstärke 10 Volt/cm. Laufzeit 4 Std.
Anfärbung: Amidoschwarz 10B

($M = 6500$) als geeignet erwiesen. Beim Chromatographieren an der Sephadex G 50 Säule hatten die beiden Toxine die Säule gleichzeitig und zusammen mit dem Lungeninhibitor passiert. Da bei der Gelfiltration gleich große Moleküle mit gleicher Geschwindigkeit „filtriert“ werden, kann man den Toxinen Molekulargewichte zwischen 5000 und 10000 zuordnen.

Eine weitere Stütze für den obigen Befund liefert der Sedimentationslauf von Toxin II in der analytischen Ultrazentrifuge, aus dem sich eine Sedimentationskonstante von $s_{20,W} = 0,96$ berechnen ließ. Da der Lungeninhibitor eine Sedimentskonstante von $s_{20,W} = 1$ hat, ermöglicht die Gegenüberstellung beider Größen, die wie bekannt Bezugsgrößen zu den Molekulargewichten darstellen, einen direkten Vergleich (KEIL u. SORMOVA 1965).

10. Polypeptidnatur

Die Polypeptidnatur beider Toxine scheint festzustehen in Anbetracht ihres N-Gehaltes, ihrer positiven Ninhydrin- und Biuretreaktion, ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, ihrer Absorptionsmaxima bei 278 nm und ihrer Hydrolysierbarkeit in Aminosäuren durch 6 n HCl.

Tabelle 3

Toxizitäten einiger, an *Carcinus maenas* getesteten, niedermolekularen Gifte der *Anemonia sulcata*

Getestete Substanz	Spezifische Aktivität (CE/mg Substanz)
Tetramethylammoniumhydroxid (Tetramin) .	8
Tetramethylammoniumchlorid	1
Histamin	16
Cholinchlorid	0
Trigonellin	0
Dialysierbare niedermolekulare Substanzen der <i>Anemonia sulcata</i>	1

11. Prüfung niedermolekularer Verbindungen auf Toxizität

Im weiteren wurden einige in der *Anemonia sulcata* früher nachgewiesene, käuflich erhältliche niedermolekulare organische Verbindungen (ACKERMANN 1953; KAISER u. MICHL 1958; MATHIAS et al. 1960; WELSH 1956, 1960) einzeln, und die niedermolekularen dialysierbaren Substanzen aus dem Anemonenextrakt (s. S. 119) in ihrer Gesamtheit an Hand von Krabbentesten als potentielle Krabbentoxine ausgeschlossen (Tab. 3).

12. Das sogenannte Anemonentoxin „Thalassin“

Bei der Suche nach dem kristallinen pruritogenen Anemonentoxin, das von RICHET gefunden (1902) und von ihm „Thalassin“ benannt wurde, hatten wir seine Isolierungsexperimente wiederholt, und zusätzlich auch neue fraktionierte Fällungsversuche zwecks Isolierung vorgenommen. In fast allen Fällen (auf die hier nicht näher eingegangen werden soll), ließ sich eine kristalline, nicht toxische weiße Substanz isolieren, die nach zweimaligem Umkristallisieren aus 95%igem Äthanol in reiner Form erhalten werden konnte. Es hat sich herausgestellt, daß es sich bei dieser Substanz um Taurin handelt.

Die Identifizierung erfolgte mittels IR-Spektrum, Zersetzungspunkt, Dünnschichtchromatogramm mit Vergleichssubstanz und Elementaranalyse.

Eine pruritogene Wirkung von Taurin an Mäusen konnte nicht festgestellt werden. Weitere kristalline Substanzen nach RICHER's und den eigenen Vorschriften konnten wir aus der *Anemonia sulcata* nicht isolieren.

IV. Diskussion

In HALSTEAD's Werk (1965) wird auf Seite 355 über zwei Gruppen von Coelenteratentoxinen berichtet, nämlich 1. hitzestabile, alkohollösliche, niedermolekulare Toxine, die aus verschiedenartigen organischen Verbindungen bestehen, und 2. hitzelabile, alkoholunlösliche, hochmolekulare Toxine von Proteincharakter. Die in dieser Arbeit isolierten toxischen Substanzen der *Anemonia sulcata* lassen sich in HALSTEAD's Einteilung nicht einordnen. Ihre Merkmale sind neben sehr hoher Toxizität das mittlere Molekulargewicht zwischen 5000 und 10000 und die verhältnismäßig hohe Hitzeresistenz.

CANTACUZÈNE u. DAMBOVICEANU hatten bereits im Jahre 1934 festgestellt, daß für die Toxizität der Seeanemone *Adamsia palliata* gegenüber *Carcinus maenas* eine nicht dialysierbare, mit Trichloressigsäure nicht inaktivierbare Substanz verantwortlich war. Im Rohtoxin der *Anemonia sulcata* liegt ein Substanzgemisch mit ähnlichen Eigenschaften vor. Die Tatsache, daß das Rohtoxin der Dialyse unterworfen werden kann, ohne daß dabei ein Schwund der Toxizität im Schlauch, d. h. ein Verlust der Toxine eintritt, kann mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine salzartige Bindung der kleineren basischen Toxine an hochmolekulare saure Anemonenproteine zurückgeführt werden, die in hohem Prozentsatz im Rohtoxin enthalten sind. Derartige Toxin-Proteinkomplexe sind bekannt, kürzlich hat MIRANDA (1966) über solche Verbindungen berichtet.

Aufgrund ihrer basischen Natur, ihres mittleren Molekulargewichtes und ihres Polypeptidcharakters zusammen mit der bekannten Giftwirkung können die Toxine I und II der *Anemonia sulcata* in die Reihe der basischen Neurotoxine eingeordnet werden, die auch für die hohe Letalität der Schlangen- und Skorpiongifte verantwortlich sind. Die Tatsache, daß in der *Anemonia sulcata* zwei elektrophoretisch voneinander deutlich unterscheidbare Toxingruppen gefunden wurden, paßt gut zu MIRANDA's Konzept (1964), der annimmt, daß alle derartigen Gifte mindestens zwei oder mehrere Neurotoxine enthalten, deren Molekulargewichte unter 20000 liegen.

Der Nachweis und die Isolierung von den in *Anemonia sulcata* eventuell noch vorhandenen hochmolekularen und hitzelabilen Proteintoxinen würde eine viel schonendere Aufarbeitung als die warme alkoholische Extraktion erfordern. Ihre Untersuchung wurde in dieser Arbeit völlig unterlassen, weil sich kein Anhalt dafür ergab, daß sie einen nennenswerten Beitrag zur Lähmung der Krabben beisteuern.

Die toxische Wirkung der in der *Anemonia sulcata* bisher nachgewiesenen kleinemolekularen Verbindungen war im Vergleich zu den Polypeptidtoxinen äußerst geringfügig und kann vernachlässigt werden. Ebenso zeigte die Gesamtheit der dialysierbaren Substanzen des Anemonenextraktes keine nennenswerte Wirkung an Krabben.

Die beiden gereinigten Toxine I und II hingegen zeigten an Krabben die gleiche krampfauslösende und lähmende Wirkung wie der rohe wäßrige Anemonenextrakt. Wir nehmen daher an, daß die krabbenlähmende Wirkung der *Anemonia sulcata* ausschließlich auf diese Polypeptidtoxine zurückzuführen ist.

Inwieweit die Polypeptidtoxine als Nesselgifte bezeichnet werden können, bleibt noch offen, da im Rahmen dieser Arbeit die Nesselzellen nicht isoliert werden konnten. Es ist jedoch mit Sicherheit anzunehmen, daß sie in hohem Maße an der Wirkung des Nesselgiftes beteiligt sind (WEILL, 1961 a, 1961 b, 1962).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt außer auf der Isolierung auf der Klärung der stofflichen Natur der toxischen Substanzen der *Anemonia sulcata*, die von RICHERT (1902, 1903) erstmalig beschrieben und von ihm Thalassin und Congestin genannt wurden. Die in dieser Arbeit isolierten Polypeptide dürften, nach ihrer physiologischen Wirkung auf Warmblüter beurteilt, zu RICHERT's Congestinfraction gehören, während eine kristalline, toxische Substanz, das Thalassin, so wie es damals dargestellt wurde (RICHERT 1903) in der *Anemonia sulcata* nicht wiedergefunden werden konnte.

Literaturverzeichnis

- ACKERMANN, D. (1953): Über das Vorkommen von Homarin, Trigonellin und einer neuen Base Anemonin in der Anthozoe *Anemonia sulcata*. Z. physiol. Chem. 295, 1.
- BIEL, H., N. HEIMBURGER, D. KRAFT, TH. KRANZ und R. SCHMIDBERGER (1964): Einige neuere analytische Methoden zur Charakterisierung der Plasmaproteine. Behringwerke Mitteilungen Heft 43, 36.
- CANTACUZÈNE, J. und A. DAMBOVICEANU (1934): Caractères physicochimiques du poison des accoties d'*Adamsia palliata*. Compt. rend. soc. biol. 117, 138.
- ERLANGER, B. F., N. KOKOWSKY und W. COHEN (1961): The preparation and properties of two new chromogenic substrates of Trypsin. Arch. Biochem. 95, 271.
- GHIRETTI, F. (1964): Biochemie der Giftstoffe von Meerestieren. Ang. Chem. 76, 982.
- HALSTEAD, B. W. (1965): Poisonous and venomous marine animals of the world. United States Government Printing Office Washington, D.C. Vol. I. p. 355.
- KAISER, E. und H. MICHL (1958): Die Biochemie der tierischen Gifte. Franz. Deuticke Vlg. Wien. S. 8.
- KEIL, B. und Z. SORMOVA (1965): Laboratoriumstechnik für Biochemiker. Akad. Verlg. Ges. Leipzig. S. 233.
- KRISCH, K. (1968): Privatmitteilung. 1. Juni.
- LANE, C. E. (1960): The toxin of *Physalia* nematocysts. Ann. N.Y. Acad. Sci. 90, 742.
- LANE, C. E. (1961): *Physalia* nematocysts and their toxin. In LENHOFF, H. M. und W. F. LOOMIS (ed.): The biology of *Hydra* and some other coelenterates. University Miami Press, Coral Gables, Fla. p. 169.
- LANE, C. E. und E. DOOSE (1958): The toxicity of *Physalia* nematocysts. Biol. Bull. 115, 219.
- MARTIN, E. J. (1963): Toxicity of dialysed extracts of some California anemones. Pacific Sci. 17, 302.
- MATHIAS, A. P., D. M. ROSS und M. SCHACHTER (1960): The distribution of 5-hydroxytryptamin, tetramethylammonium, homarine and other substances in sea anemones. J. Physiol. 151, 296.
- MIRANDA, F., H. ROCHAT and S. LISSITZKY (1966): Complexes moléculaires présentés par les neurotoxines animales. I. Neurotoxines des venins de scorpions (*Androctonus australis* HECTOR et *Buthus occitanus tunetanus*). Toxicon 4, 123.
- MIRANDA, F., H. ROCHAT and S. LISSITZKY (1964): Sur les neurotoxines de deux espèces de scorpion nordafricaines II. Déterminations préliminaires aux études de structure sur les neurotoxines (scorpamines) d'*Androctonus australis* et de *Buthus occitanus* (Am.) Toxicon 2, 123.
- PERRET, J. (Thèse 1907): Contribution à l'étude des poisons des actinies. Zitiert bei COSMOVICI, N. L. (1925). Compt. rend. soc. biol. 92, 1373.

- RICHET, C. (1902): Du poison pruritogène et urticant contenu dans les tentacules des actinies. *Compt. rend. soc. biol.* 54, 1438.
- RICHET, C. (1903a): Des poisons contenus dans les tentacules des actinies (congestine et thalassine) *Compt. rend. soc. biol.* 55, 246.
- RICHET, C. (1903b): De la thalassin, toxin cristallisée pruritogène. *Compt. rend. soc. biol.* 55, 707.
- RICHET, C. (1905): Notizen über Thalassin. *Arch. ges. Physiol. (Pflügers)* 108, 369.
- SHAPIRO, B. I. (1968): Purification of a toxin from tentacles of the anemone *Condylactis gigantea*. *Toxicon* 5, 253.
- SONDERHOFF, R. (1936): Über das Gift der Seeanemonen. I. Ein Beitrag zur Kenntnis der Nesselgifte. *Ann. Chem.* 525, 138.
- WEILL, R. (1961a): Obtention expérimentale de cnidaires à tentacules démunis de nematocystes. *Compt. rend. seances l'Acad. sci.* 252, 324.
- WEILL, R. (1961b): Une technique simple d'extraction du venin des nematocystes d'*Anemonia sulcata*. *Compt. rend. seances l'Acad. sci.* 252, 455.
- WEILL, R. (1962): Resistance à la chaleur et auf froid des nematocystes tentaculaires d'*Anemonia sulcata*. *Compt. rend. seances l'Acad. sci.* 254, 4345.
- WELSH, J. H. (1956): On the nature and action of coelenterate toxins. *Deep Sea Res., Suppl.* 3, 287.
- WELSH, J. H. (1961): Compounds of pharmacological interest in coelenterates p. 179. In H. M. LENHOFF u. W. F. LOOMIS (ed.), *The biology of Hydra and of some other coelenterates*. Univ. Miami Press, Coral Gables, Fla.
- WELSH, J. H. and P. B. PROCK (1958): Quaternary ammonium bases in the coelenterates. *Biol. Bull.* 115, 551.