

Biochemie der Giftstoffe von Meerestieren [*]

VON PROF. DR. F. GHIRETTI

INSTITUT FÜR ALLGEMEINE PHYSIOLOGIE DER UNIVERSITÄT SASSARI UND
ZOOLOGISCHE STATION, ABTEILUNG FÜR PHYSIOLOGIE UND BIOCHEMIE,
NEAPEL (ITALIEN)

Meeresorganismen fast aller Klassen produzieren für Angriff und Verteidigung toxische Substanzen, beispielsweise aliphatische und aromatische Amine, Cholinester, Steroid-glykoside, komplizierte heterocyclische Systeme, Polypeptide und Proteine.

1. Amine

a) Tetramin

Tetramethylammonium-hydroxyd (Tetramin) ist das wichtigste toxische Prinzip in Extrakten und giftigen Sekreten einiger wirbelloser Tiere, z. B. der Seeanemone [9] und der marinen Gastropoden (Schnecken) der Gattungen *Neptunea* und *Conus* [10–12]. Es wirkt ähnlich wie Curare, jedoch nicht so selektiv. In niedrigen Dosen beeinflußt es Herz und Zentralnervensystem; bei höheren Dosen wurden Lähmungserscheinungen (an Fischen, Fröschen und Mäusen) beobachtet. Tetramin verursacht eine Kontraktion des Froschdarmes, der durch (+)-Tubocurarin entgegengewirkt werden kann [13].

Die Lähmung von Crustaceen (Krebsen) durch Berührung mit den Tentakeln von Coelenteraten (Hohltieren) wurde ebenfalls dem Tetramin zugeschrieben [14], das allerdings die Reizleitung in einem Nerv-Muskel-Präparat von *Maia* nicht zu blockieren vermag.

In den Coelenteraten *Actinia equina* und *Anemonia sulcata* wurden Tetramin-Gehalte von 2 bzw. 1 mg/g Frischgewebe gefunden [13]. Nach *Fänge* [11] ist Tetramin (maximal 30 mg/g frische Drüse) als giftige Hauptkomponente im Speichelgift von *Neptunea antiqua* enthalten. Im gleichen Organ der nahe verwandten

[*] Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Vertrags mit dem U.S.-Dept. of the Army, European Research Office, ausgeführt. Zusammenfassende Arbeiten zum gleichen Thema siehe [1–8].

[1] *M. Phisalix*: Animaux venimeux et venins. Masson, Paris 1922, Bd. 2.

[2] *E. N. Pawlowsky*: Gifttiere und ihre Giftigkeit. G. Fischer, Jena 1927.

[3] *C. H. Kellaway*, Ann. Rev. Biochem. 8, 541 (1939).

[4] *C. H. Taft*, Texas Dept. Biol. Med. 3, 339 (1945).

[5] *E. Kaiser u. H. Michl*: Die Biochemie der tierischen Gifte. F. Deuticke, Wien 1958.

[6] *B. W. Halstead* in *E. E. Buckley u. N. Porges*: Venoms. Amer. Assoc. for the Advancement of Science, Washington 1956.

[7] *D. A. Courville, B. W. Halstead u. D. W. Hessel*, Chem. Reviews 58, 235 (1958).

[8] *F. Crescitelli u. J. A. Geissman*, Ann. Rev. Pharmacol. 2, 143 (1962).

[9] *D. Ackermann, F. Holz u. H. Z. Reinwein*, Z. Biol. 79, 113 (1923).

[10] *M. Asano u. M. Itoh*, Ann. New York Acad. Sci. 90, 674 (1960).

[11] *R. Fänge*, Ann. New York Acad. Sci. 90, 689 (1960).

[12] *A. J. Kohn, P. R. Saunders u. S. Wiener*, Ann. New York Acad. Sci. 90, 706 (1960).

[13] *A. P. Mathias, D. M. Ross u. M. Schachter*, J. Physiology 151, 296 (1960).

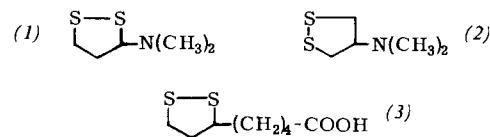
[14] *J. H. Welsh*, Nature (London) 186, 811 (1960).

Art *Neptunea arthritica* fanden *Asano* und *Itoh* [10] nur 7 bis 9 mg/g Drüse. Thalassin aus den Tentakeln von Seeanemonen [15] und Tetramin sind nach *Mathias* nicht identisch [13].

Das Speichelgift mariner Gastropoden und die Fadenzellen der Coelenteraten enthalten außer Tetramin u. a. Histamin, Cholin, N-Methyl-pyridiniumhydroxyd, N-Methyl-2-picolin-säure-betaïn (Homarin) und γ -Butyro-betaïn. Zwar haben die meisten dieser Substanzen keine unmittelbare biologische Aktivität, aber die Möglichkeit, daß sie als Synergisten des Tetramins wirken, ist nicht auszuschließen.

b) Nereistoxin

Nereistoxin ist das toxische Prinzip des marinen Ringelwurms *Lumbriconereis heteropoda* [16, 17]. Fleischfressende Insekten gehen zugrunde, wenn sie mit dem toten Ringelwurm in Berührung kommen. *Nitta* konnte die Substanz kristallin erhalten. *Hashimoto* und *Okaichi* [18] wiesen nach, daß Nereistoxin [(1) oder (2)] ein tertiäres Amin mit einem Disulfidring ist; es ähnelt dem nach der Liponsäure (3).



Nereistoxin hat eine starke Wirkung auf das Nervensystem, aber kaum auf andere Organe und Blut. Tiere, denen das Gift eingespritzt wird, zeigen Pupillenverengung, Speichel- und Tränenfluß sowie eine verstärkte Bewegung der glatten Darmmuskulatur. Die tödliche Dosis beträgt 0,38 mg/10 g bei der Maus und 1,8 mg/kg beim Kaninchen nach subkutaner Injektion. Fische sind empfindlicher als Warmblüter.

c) 5-Hydroxy-tryptamin

Erspamer erhielt 1940 einen biologisch wirksamen Acetonextrakt aus den rückwärtigen Speicheldrüsen von Kraken, der Enteramin enthielt. Die gleiche Substanz wurde im Hypobranchialorgan von *Muricidae* sowie

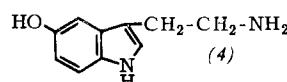
[15] *C. Richet*, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 108, 369 (1905).

[16] *S. Nitta*, J. pharmac. Soc. Japan (Yakugakuzasshi) 54, 648 (1934).

[17] *S. Nitta*, Tokyo J. med. Sci. 55, 285 (1941).

[18] *Y. Hashimoto u. T. Okaichi*, Ann. New York Acad. Sci. 90, 667 (1960).

im Verdauungstrakt von Ascidien [19, 20] nachgewiesen und aus den rückwärtigen Speicheldrüsen von *Octopus vulgaris* und der Haut des amphibischen *Discoglossus pictus* isoliert. Enteramin ist 5-Hydroxy-tryptamin (4) [21, 22].



5-Hydroxy-tryptamin (Serotonin) wurde 1948 auch aus Ochsenblut kristallin erhalten. Serotonin und Enteramin aus *Octopus* haben die gleichen chemischen und biologischen Eigenschaften [23].

Giftanlagen und toxische Sekrete sind die besten Quellen für 5-Hydroxy-tryptamin bei den Wirbellosen. Es kommt bei vielen Wirbellosen vor (Tabelle 1), fehlt aber

Tabelle 1. Vorkommen von 5-Hydroxy-tryptamin [μg Frischgewebe].

In Speicheldrüsen von Mollusken:		
<i>Octopus vulgaris</i>	420–510	
<i>Eledone moschata</i>	760	
<i>Octopus macropus</i>	0	
<i>Sepia officinalis</i>	0	
<i>Murex trunculus</i>	80–290	
In Coelenteraten:		
<i>Calliactis parasitica</i>		
Gewebe der Leibeshöhle	500–600	
Körperwand, äußere Schicht	15–35	
Tentakeln	5–15	
Isolierte Akontien	20	
<i>Metridium senile</i>	2	
<i>Anemonia sulcata</i>	2	
<i>Physalia physalis</i>	2	
<i>Actinia equina</i>	5 [a]	

[a] Biologischer Test; nicht chromatographisch identifiziert.

z. B. bei den Cephalopoden in den Extrakten aus der rückwärtigen Speicheldrüse von *Octopus macropus* und *Sepia officinalis* sowie den vorderen Speicheldrüsen von *Octopus vulgaris*. In den Geweben von Coelenteraten wie *Metridium senile*, *Anemonia sulcata* und *Physalia physalis* wurde kein Enteramin gefunden.

Die unregelmäßige Verbreitung von 5-Hydroxy-tryptamin in den Giftapparaten mariner Wirbelloser führt zur Frage nach seiner biologischen Bedeutung. Die Substanz könnte als Herzregulans bei Mollusken dienen [24] oder bei einigen wirbellosen Tieren für die Reizleitung von Bedeutung sein [25–27]. In der Nervensubstanz primitiver und wenig spezialisierter wirbelloser Organismen ist anscheinend mehr 5-Hydroxy-tryptamin vorhanden als bei höheren Organismen [27].

[19] V. Ersperer: Il sistema cellulare enterocromaffine e l'enteramina (5-idrossitriptamina). Rend. Farmitalia Bd. I, Farmitalia, Milano 1954.

[20] V. Ersperer, Pharmacol. Rev. 6, 425 (1954).

[21] V. Ersperer u. B. Asero, Nature (London) 169, 800 (1952).

[22] V. Ersperer u. B. Asero, J. biol. Chemistry 200, 311 (1953).

[23] Z. M. Bacq, P. Fischer u. F. Ghiretti, Arch. int. Physiol. 60, 165 (1952).

[24] V. Ersperer u. F. Ghiretti, J. Physiology 115, 470 (1951).

[25] J. H. Welsh, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 219, 23 (1953).

[26] J. H. Welsh, Ann. New York Acad. Sci. 66, 618 (1957).

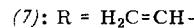
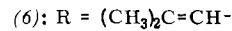
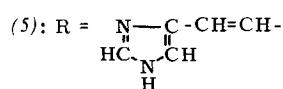
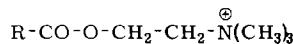
[27] J. H. Welsh u. M. Moorhead, J. Neurochem. 6, 146 (1960).

Nach der Entdeckung von 5-Hydroxy-tryptamin in den Geweben von Coelenteraten wurde vermutet, daß es mindestens teilweise für die toxische Reaktion verantwortlich ist, die der Berührung der Tentakeln folgt [28]. Die isolierten, gereinigten Fadenzellen enthalten aber kein oder nur wenig 5-Hydroxy-tryptamin [29]. Auch die fadenzellen-reichen Tentakeln von *Calliactis parasitica* weisen nur wenig 5-Hydroxy-tryptamin auf, obwohl sich in der Leibeshöhle dieses Tieres große Mengen der Substanz befinden. In den Giftsekreten anderer Coelenteraten kommt das Amin überhaupt nicht vor. Es ist gewöhnlich mit anderen Stoffen vergesellschaftet, die ebenfalls biologisch aktiv sein können.

Coelenteraten z. B. enthalten auch größere Mengen Tetramin und andere Stickstoffbasen. So kommen im Speichelsecret von *Octopus vulgaris* noch Tyramin, Histamin, Acetylcholin, Taurin, Dopamin und Octopamin (p-Hydroxyphenyläthanamin) vor [30–33]. Einige dieser Substanzen haben keine oder nur eine geringe biologische Aktivität. Da Tyramin eine gewisse Wirkung hat, wurde es als der spezifische Wirkstoff in den Toxinen der Cephalopoden angesehen [34, 35].

Man darf wohl annehmen, daß 5-Hydroxy-tryptamin relativ wenig toxisch ist und nur indirekt zur Giftigkeit der Sekrete beiträgt. Es ist auch postuliert worden, daß es die Resorption und den Transport der eigentlich toxischen Bestandteile der Giftsekrete erleichtert. [36].

2. Cholinester



a) Murexin

Murexin (Imidazolyl-acryloyl-cholin) (5) wurde aus den Hypobranchialdrüsen einiger Gastropoden der Familie *Muricidae* (Purpurschnecken) isoliert [37, 38]. Die Hypobranchialkörper dieser Tiere produzieren die Vorstufe des antiken Purpurs. Außerdem enthalten sie größere Mengen einer Substanz, die für Wirbeltiere toxischer ist als Acetylcholin [39]. Injiziert man Wirbeltieren Extrakte der Drüsen, so tritt momentane Mus-

[28] J. H. Welsh, Nature (London) 186, 811 (1960).

[29] J. H. Phillips u. D. P. Abbott, Biol. Bull. 113, 296 (1957). [30] A. P. Mathias, D. M. Ross u. M. Schachter, J. Physiology 151, 296 (1960).

[31] W. J. Hartmann, W. G. Clark, S. D. Cyr, A. L. Jordan u. R. A. Leibhold, Ann. New York Acad. Sci. 90, 637 (1960).

[32] F. Ghiretti, Arch. sci. Biol. 37, 435 (1953).

[33] F. Ghiretti, Ann. New York Acad. Sci. 90, 726 (1960).

[34] M. Z. Henze, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 87, 51 (1913).

[35] F. Bottazzi, Pubbl. Staz. Zool. Napoli (Ric. Fis. Chim. Biol.) 1, 69 (1922).

[36] I. H. Page, Physiol. Rev. 38, 277 (1958).

[37] V. Ersperer u. O. Benati, Biochem. Z. 324, 66 (1953).

[38] V. Ersperer u. O. Benati, Science (Washington) 117, 161 (1953).

[39] R. Dubois, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 55, 81 (1903).

kellähmung ein. Extrakte aus den Drüsen von *Murex* bewirken eine Kontraktion des Blutegelmuskels; dieser Effekt verschwindet langsam, wenn man die Extrakte mit Seren aus Säugetieren inkubiert [40]. Dieser Zusammenhang führte zur Entdeckung des Murexins (5) [41, 42] und seiner Identifizierung als Imidazolyl-4-acryloyl-cholin (Urocanylcholin). Die vorgeschlagene Konstitution wurde durch Synthese bestätigt [43].

Murexin wurde aus Acetonextrakten der Hypobranchialkörper von *Murex trunculus*, *M. brandaris* und *Tritonalia erinacea* gewonnen und chromatographisch gereinigt [44, 45]. Bei der Papierchromatographie liefert Murexin Flecke, die im UV-Licht, durch Einwirkung von Joddämpfen [46] oder durch Besprühen mit Ninhydrin sowie den Reagentien nach *Pauli*, *Ehrlich*, *Folin* und *Ciocalteau* sichtbar gemacht werden können. Es absorbiert bei pH = 4,5 bei 285 m μ . Der Extinktionskoeffizient beträgt 1,67 · 10⁴ [43].

Bisher ist Murexin nur in drei im Mittelmeer [37, 38] und drei im Nordatlantik [47] vorkommenden Arten von Trompetenschnecken der Familie *Muricidae* gefunden worden. Tabelle 2 zeigt den Murexingehalt mariner Gastropoden. Einige nicht-farbstoffbildende Gastropoden sowie die pflanzenfressenden, nicht-räuberischen Lamellibranchier (Muscheln) enthalten überhaupt kein Murexin [48].

Tabelle 2. Murexingehalte mariner Gastropoden [mg/g Frischgewebe].

<i>Murex trunculus</i>		
Hypobranchialdrüse		
median Zone, rückwärtiger Teil	33–46	[37]
median Zone, vorderer Teil	11–16	[37]
branchiale Zone	1,2	[37]
rektale Zone	1,0	[37]
<i>Murex brandaris</i>		
Hypobranchialdrüse, mediane Zone	1,3	[51]
<i>Tritonalia erinacea</i>		
ganzer Organismus	7,6	[37]
<i>Murex fulvescens</i>		
ganzer Organismus	1,4	[45]
<i>Urosalpinx cinereus</i>		
ganzer Organismus	0,36	[48]
<i>Thais lapillus</i>		
ganzer Organismus	0,2	[48]
Hypobranchialdrüse	5,3	[48]

Murexin wird durch Cholinesterase aus roten Blutkörperchen von Rindern nicht hydrolysiert [49, 50]. Die Grundwirkung des Murexins besteht in einer Lähmung der Skelettmuskulatur; der Tod wird durch periphere

- [40] D. Vincent u. A. Jullien, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 127, 1506 (1938).
- [41] V. Erspermer, Experientia 4, 226 (1948).
- [42] V. Erspermer u. F. Dordoni, Arch. int. Pharmacodynam. 74, 263 (1947).
- [43] C. Pasini, A. Vercellone u. V. Erspermer, Liebigs Ann. Chem. 578, 6 (1952).
- [44] J. E. Gardiner u. V. P. Whittaker, Biochem. J. 58, 24 (1954).
- [45] M. J. Keyl, J. A. Michaelson u. V. P. Whittaker, J. Physiology 139, 434 (1954).
- [46] V. P. Whittaker u. S. Wijesundera, Biochem. J. 51, 348 (1952).
- [47] V. P. Whittaker u. J. A. Michaelson, Biol. Bull. 107, 304 (1954).
- [48] M. J. Keyl u. V. P. Whittaker, Amer. J. Physiol. 183, 634 (1955).
- [49] M. J. Keyl u. V. P. Whittaker, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 13, 103 (1958).
- [50] M. E. Grelis u. J. J. A. Tabachnik, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 12, 320 (1957).

Atemlähmung und anschließende Anoxämie herbeigeführt. Das Herz schlägt noch einige Minuten lang kräftig weiter, nachdem die Atmung schon ausgesetzt hat [51]. Bei Säugetieren wirkt Murexin wie andere Nerv-Muskel-Blockierungsmittel, z. B. Dekamethonium und Suxamethonium.

Murexin zeigt zwei der drei pharmakologischen Effekte des Cholins und seiner Derivate: Eine erregende Wirkung auf die Ganglien und eine Blockade der Reizübertragung vom Nerven auf den Muskel. Im Rattentest wurde gezeigt, daß diese neuromuskuläre Blockade vom depolarisierenden Typ ist. Ähnlich führte Quilliam [52] am Fußmuskel des Frosches den Nachweis, daß Murexin das Gebiet der Endplatte depolarisiert. Ganz ähnliche Effekte beobachtet man bei Suxamethonium, Dekamethonium und Acetylcholin. Murexin hat dabei etwa dieselbe depolarisierende Kraft wie Dekamethonium, wirkt aber nur etwa ein Zehntel so stark wie Suxamethonium und Acetylcholin.

Das Material, das *Murex* für die Biosynthese des Murexins zur Verfügung steht, ist in lebenden Organismen weit verbreitet: es sind Cholin und Urocansäure (Imidazolyl-acrylsäure) oder ein aus dem Histidin-Stoffwechsel stammender Vorläufer. Ähnliche Synthesen dürften auch im Zentralnervensystem von Wirbeltieren ablaufen.

b) Seneciolykholin

Seneciolykholin (6) [53–55] wurde in dem marinem Gastropoden *Thais floridiana* entdeckt. Es kommt in relativ großen Konzentrationen in der Hypobranchialdrüse vor. Die nahe verwandte Art *Thais lapillus* bildet stattdessen Murexin (siehe Tabelle 2).

Seneciolykholin ist β,β -Dimethylacryloylcholin (6). Bei der Säulenchromatographie eines Extraks der Hypobranchialdrüsen aus *T. floridiana* erscheint es in Form eines breiten, aber wohldefinierten Bereichs, wenn man mit saurem Phosphatpuffer eluiert. Das gereinigte Material absorbiert bei 222 m μ , was auf den Ester einer α,β -ungesättigten Fettsäure hinweist. Alkalische Hydrolyse und anschließende Wasserdampfdestillation des angesäuerten Hydrolysats in Gegenwart von Magnesiumsulfat liefern eine flüchtige Säure in 24 bis 92 % Ausbeute. Absorptionspektrum, Titrationsdaten, Jodzahl und Wasserstoffaufnahme stehen mit der Struktur einer Acrylsäure in Einklang. Durch Mikrohydrierung erhält man Isovaleriansäure; ursprünglich lag also β,β -Dimethylacryloylcholin vor. Natürliches und synthetisches Material sind identisch. β,β -Dimethylacrylsäure kommt auch frei in der Natur vor und spielt bei der Biosynthese von Terpenen, Steroiden und Kautschuk eine Rolle.

Das Auftreten einer aktiven Histidin-desaminase in *T. lapillus* läßt vermuten, daß Senecio- (8) und Urocanc-

[51] V. Erspermer u. A. Glaser, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 12, 176 (1957).

[52] J. P. Quilliam, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 12, 388 (1957).

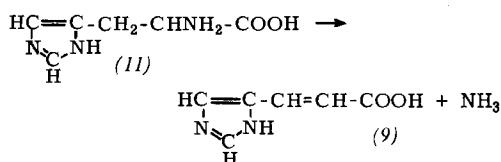
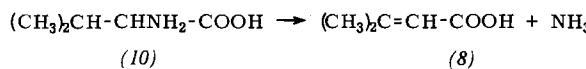
[53] V. P. Whittaker, Biochem. J. 66, 35 P (1957).

[54] V. P. Whittaker, Biochem. J. 71, 32 (1959).

[55] B. Holmstead u. V. P. Whittaker, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 13, 308 (1958).

säure (9) aus Valin (10) bzw. Histidin (11) gebildet werden. Das Vorkommen verschiedener Ester in zwei so nahe verwandten Arten wie *T. floridiana* und *T. lapillus* könnte auf einem verschiedenen starken Angebot der Aminosäuren in der Nahrung beruhen.

Der Ester (6) ist wie Murexin ein mäßig wirksames nervenmuskel-blockierendes Mittel vom depolarisierenden Typ und besitzt eine erregende Wirkung auf die Ganglien. Gleichfalls kann (6) als starkes Atemstimulans wirken [55].



Daß die von Dimethyl-acryloylcholin hervorgerufene Hemmung vom depolarisierenden Typ ist, geht daraus hervor, daß der von Murexin herbeigeführte Effekt gesteigert wird. Außerdem wurde eine kurzdauernde Membrandepolarisation direkt gemessen, als man das Toxin nahe einer Endigung der motorischen Endplatte eines isolierten Katzenmuskels einwirken ließ. Die Depolarisation hält länger an als die von Acetylcholin erzeugte. Wie Murexin wird auch Seneciolykholin nur sehr langsam von Plasma-Cholinesterase angegriffen; Cholinesterase aus roten Blutkörperchen und aus elektrischen Organen verändert es praktisch überhaupt nicht [49, 50].

c) Acrylcholin

Die aktive Substanz aus den Hypobranchialdrüsen von *Buccinum undatum* (Familie der *Buccinidae*, einer nicht-farbstoffbildenden Gruppe von Gastropoden) erwies sich ebenfalls als Cholinester [56]. In den Hydrolysaten der aktiven Fraktion wurde Cholin chromatographisch nachgewiesen. Der Ester (7), chemisch mit den Estern (5) und (6) verwandt, wurde wie Seneciolykholin identifiziert. Durch Wasserdampfdestillation des Hydrolysats wurde hier Acrylsäure abgetrennt.

Acrylcholin hat sowohl einen nicotin-ähnlichen Effekt als auch eine neuromuskuläre Blockwirkung [55]. Im Gegensatz zum Acetylcholin ist es am Dünndarm des Meerschweinchens unwirksam.

3. Holothurin

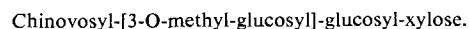
Die giftige Wirkung einiger *Holothurioidea* (Seewalzen, Seegurken) aus der Klasse der *Echinodermata* (Stachelhäuter) gegenüber Fischen und anderen Tieren ist seit langem bekannt. Eingeborene der Tropen pressen schwarze Seegurken aus und schütten den Inhalt in die Lagunen von Korallenriffen, um die betäubten Fische leichter zu fangen.

[56] V. P. Whittaker, Ann. New York Acad. Sci. 90, 695 (1960).

Holothurioidea sind in der Lage, ihre eigenen Eingeweide abzustoßen. Danach kann eine vollkommene Regeneration stattfinden. Diese Ausstoßung vermag spontan einzutreten oder unter Umwelteinflüssen wie Sauerstoffmangel, Temperaturanstieg sowie elektrischer oder magnetischer Erregung. Auch das Cuviersche Organ, das als ein modifiziertes Atemsystem angesehen wird, kann ausgestoßen werden. Diese Röhrchen erscheinen im Wasser als eine Masse klebriger Fäden. In ihrer Umgebung wird das Wasser für Tiere extrem giftig.

Der aktive Faktor bekam die Bezeichnung Holothurin [57]. Aus dem Cuvierschen Organ der bei den Bahama-Inseln verbreiteten Seegurken *Actinopyga agassizi* Selenka erhielt Nigrelli wäßrige Extrakte, aus denen Holothurin kristallisiert wurde. Eine Substanz, die dem Holothurin ähnelt und mit ihm vielleicht identisch ist, erhielt man aus *Holothuria vagabunda* [58, 59].

Das giftige, wasserlösliche und hitzebeständige Holothurin liefert bei der sauren Hydrolyse einige miteinander verwandte Steroidglykone und eine Mischung von Zuckern [57, 60]; es ist das erste Steroidsaponin tierischen Ursprungs, das den herzwirksamen Glykosiden der Pflanzen entspricht. Aus dem wäßrigen Extrakt an der Sonne getrockneter Cuvierscher Organe wird mit Cholesterin Holothurin A gefällt. Die Holothurin A-Fraktion ähnelt dem Digitonin und anderen Saponinen, indem sie mit Cholesterin Komplexe bildet. Die reine Substanz ($C_{50-52} H_{81-85} O_{5-6}$ SNa, Molekulargewicht 1150–1200) [60, 61] absorbiert ultraviolettes Licht nicht, hat im IR-Spektrum Banden für eine Doppelbindung sowie für ein Fünf- oder Sechsringlacton und enthält ein Äquivalent Schwefelsäure in esterartiger Bindung. Holothurin A ist ein Gemisch von Schwefelsäureestern mehrerer ähnlicher Glykoside, welche die gleiche Folge von vier Monosacchariden in Verknüpfung mit etwas unterschiedlichen Steroidglykonen enthalten. Die Zucker (nach saurer Hydrolyse) sind als Glucose, Xylose, 3-O-Methyl-glucose und Glucomethylose (Chinovose) identifiziert worden. Ihre Sequenz wurde durch enzymatische Untersuchungen mit Extrakten aus dem Verdauungsorgan von *Helix pomatia* festgelegt. Aus dem Hydrolysat wurden neben den Monosacchariden isoliert: Chinovosyl-3-O-methyl-glucose, 3-O-Methyl-glucosyl-glucose und 3-O-Methyl-glucosyl-glucosylxylose. Entsprechend wird als Monosaccharid-Sequenz im Holothurin vorgeschlagen:



Wie enzymatische Studien gezeigt haben, ist die Schwefelsäure an das Steroidglykon gebunden und nicht an die Zuckerkette [62]. Holothurin ist praktisch für alle Wirbellosen giftig, einschließlich der *Holothurioidea*,

[57] R. F. Nigrelli, Zoologica 37, 89 (1952).

[58] T. Yamanouki, Publ. Seto Mar. Biol. 4, 184 (1955).

[59] T. Matsuno u. T. Yamanouki, Nature (London) 191, 75 (1961).

[60] R. F. Nigrelli, J. D. Chanley, S. K. Kohn u. H. Sobotka, Zoologica 40, 47 (1955).

[61] J. D. Chanley, R. Ledeon, J. Wax, R. F. Nigrelli u. H. Sobotka, J. Amer. chem. Soc. 81, 5180 (1959).

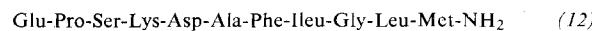
[62] J. D. Chanley, J. Perlstein, R. F. Nigrelli u. H. Sobotka, Ann. New York Acad. Sci. 90, 902 (1960).

die das Gift hervorbringen. Die Reaktionen dieser Tiere können von Reizbarkeit bis zum Tod führen, wenn man sie in Wasser bringt, das die Eingeweide von Seegurken enthält [63, 64]. Besonders Fische sind sehr empfindlich gegen Holothurin, selbst die Arten, die in Symbiose mit der Seegurke leben, wie *Carapus*. Dem Stadium der Reizbarkeit folgt Verlust der Bewegungsfähigkeit und des Gleichgewichtssinnes, Kiemenbluten und Tod. – Holothurin beeinflußt auch die Entwicklung von Seeigel-eiern. Zellteilung und Bildung der Radiärsymmetrie, aber auch Anomalitäten an den entstehenden Larven sind die Folgen eines spezifischen Angriffs an den Zellproteinen. Bei Pflanzen wurde eine Abtötung der Wurzel spitzen von Zwiebeln und eine Unterdrückung der Wurzelhaarbildung bei der Wasserkresse festgestellt. Holothurin zeigt in vivo und in vitro hämolytische Wirkungen. An Fröschen und an roten Blutkörperchen von Kaninchen wirkt es stärker hämolytisch als Saponin. Die an Fischen beobachteten Symptome lassen vermuten, daß Holothurin verschiedene Wirkungen auf das Nervensystem hat. Die gereinigte, kristalline Substanz übt auf den isolierten Ischiasnerven des Ochsenfrosches sowie auf Nerv-Zwerchfell-Präparate der Ratte [64] einen starken Effekt aus, der zu einer unmittelbaren Kontraktion der betreffenden Muskeln führt. Holothurin ist daher ein dem Cocain, Procain und Physostigmin vergleichbares Nervengift, dessen Wirkung aber irreversibel ist.

4. Eledoisin

Acetonische und alkoholische Extrakte aus den rückwärtigen Speicheldrüsen von *Eledone moschata* und *E. aldrovandi* (im Mittelmeer verbreiteten Krakenarten) enthalten eine Substanz mit stark hypotensiver Wirkung auf Ratte, Kaninchen, Hund und Mensch. Sie regt die glatte Muskulatur von Dickdarm, Dünndarm und Uterus dieser Organismen kräftig an, nicht jedoch den Darm von Cephalopoden [65]. Die aktive Substanz, Eledoisin (Moschatin), wurde vor kurzem in reiner Form isoliert und als ein aus elf Aminosäuren bestehendes Peptid identifiziert [66].

Reines Eledoisin (12) ist papierchromatographisch und elektrophoretisch einheitlich. Es ist in neutralem und schwach saurem Medium stabil, wird aber von starken Säuren, noch rascher von starkem Alkali, zersetzt. Bei der sauren Hydrolyse erhält man elf Aminosäuren in äquimolaren Mengen. Sie konnten durch chemischen und enzymatischen Abbau des Polypeptids identifiziert und in ihrer Sequenz festgelegt werden [67]; alle haben L-Konfiguration.



[63] R. F. Nigrelli u. S. Jakowska, Ann. New York Acad. Sci. 90, 884 (1960).

[64] S. L. Friess, F. G. Standaert, E. R. Whitcomb, R. F. Nigrelli, J. D. Chanley u. H. Sobotka, Ann. New York Acad. Sci. 90, 893 (1960).

[65] V. Erspamer, Experientia 5, 79 (1949).

[66] V. Erspamer u. A. Anastasi, Experientia 18, 58 (1962).

[67] E. Sandrin u. R. A. Boissonnas, Experientia 18, 59 (1962).

Extrakte aus der Verdauungsdrüse (Hepatopankreas) von Cephalopoden desaktivieren Eledoisin in 10 min zu 90–95 %. Dagegen scheinen die Speicheldrüsen dieser Tiere nur wenig eledoisin-desaktivierende Enzyme zu enthalten. Das Peptid wird schnell und vollständig durch Chymotrypsin, weniger vollständig und langsamer durch Trypsin desaktiviert. Keine Inaktivierung, selbst bei stundenlanger Inkubation, beobachtete man mit Carboxypeptidase [68].

Die Speicheldrüsen anderer Cephalopoden (*Octopus vulgaris* und *O. macropus*) enthalten überhaupt kein Eledoisin. Unter den Geweben von *Eledone* enthält ausschließlich die rückwärtige Speicheldrüse das Polypeptid (65 bis 155 γ/g Frischgewebe). Der Gehalt ist maximal in mittelgroßen Jungtieren, während ältere Tiere stattdessen einen höheren Gehalt an einfachen Aminen aufweisen. Erspamer [68] vermutete daher, daß das Eledoisin von einem größeren Eiweißkörper abgespalten wird. Eledoisin fehlt, soweit bekannt, in sämtlichen Organen mariner Gastropoden und Lamellibranchiern.

Eledoisin wirkt bei den meisten Tierarten stark gefäß erweiternd und blutdrucksenkend [69]. Alle Präparate der glatten Darmmuskulatur, die bisher untersucht wurden, sowie die Muskeln der Bronchien des Meerschweinchens sind sehr empfindlich. Am betäubten Hund bewirken bereits Injektionen von 25–100 γ/kg Körpergewicht einen 6- bis 10 Std. anhaltenden Blutdruckabfall; 0,3 mg/kg führen zu Herzfehl funktionen und können den Tod bewirken.

5. Mytilotoxin

Die klinischen Symptome der Muschelvergiftung reichen von Stechen und Gefühllosigkeit in Lippen, Zunge und Fingerspitzen über Kraftlosigkeit in der Muskulatur des Nackens und der Extremitäten bis zu Atemnot und schließlich Tod durch Atemlähmung.

Die Vergiftungen wurden mit dem Auftreten von „Roten Gezeiten“ in den Fanggebieten der Muscheln in Zusammenhang gebracht [70]. Von Zeit zu Zeit erscheinen weite Flächen der Ozeane gelb oder rot und beginnen zu lumineszieren; gleichzeitig kommt es zu einem Massensterben von Meerestieren. Farbwechsel und Eintrübung des Meerwassers beruhen auf einer lawinenartigen Vermehrung von Mikroorganismen wie *Gonyaulax*, *Gymnodinium* und *Pyrodinium* aus der Gruppe der Dinoflagellaten (Panzergelälgen). Diese Mikroorganismen werden von vielen Tierarten verzehrt, auch von den Tieren, die ihre Nahrung „filtrieren“. Muscheln, die sich von giftigen Dinoflagellaten ernähren, nehmen selbst keinen Schaden, werden aber giftig, weil sie das Gift in ihrer Verdauungsdrüse (Hepatopankreas) anreichern. Dadurch werden sie zum Überträger des Gif tes [71].

Die Untersuchungen über das Muschelgift (Mytilotoxin, Saxitoxin) gingen einerseits von Kulturen der Flagel-

[68] A. Anastasi u. V. Erspamer, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 19, 326 (1962).

[69] V. Erspamer u. G. Erspamer-Falconieri, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 19, 337 (1962).

[70] E. J. Schantz, Ann. New York Acad. Sci. 90, 847 (1960).

[71] H. Sommer, W. F. Whedon, C. A. Kofoid u. R. Stohler, Arch. Pathology 24, 537 (1937).

laten aus, die man für das Massensterben im Meer verantwortlich machte, andererseits von toxisch gewordenen Muscheln. Bisher wurde noch kein reines Flagellaten-Toxin isoliert; die chemischen und physikalischen Eigenschaften des teilweise gereinigten Materials stimmen aber mit denen des Muschelgiftes überein [72]. Mytilotoxin aus Verdauungsorganen der Miesmuschel (*Mytilus californianus*) und Siphonen der alaskanischen Buttermuschel (*Saxidomus giganteus*) wurde rein [73–77], aber nicht kristallin gewonnen.

Es ist ein weißes, amorphes Pulver mit der sehr hohen spezifischen Aktivität von 5500 ME/mg. [Eine Mäuseeinheit (ME) ist die Giftmenge, die 20 g schwere Mäuse bei intraperitonealer Injektion im Mittel innerhalb von 15 min tötet.] Bei der Gegenstromverteilung zeigt sich, daß das Gift in zwei „tautomeren“ Formen vorkommt, deren spezifische Aktivitäten etwas oberhalb und unterhalb 5500 ME/mg liegen [78].

Mytilotoxin besitzt basische Eigenschaften und bildet mit Mineralsäuren Salze. Sein Dihydrochlorid $C_{10}H_{17}N_7O_4 \cdot 2 HCl$, $[\alpha]_D^{25} = 130 \pm 5^\circ$ ist am besten zu reinigen; es ist löslich in Wasser, Methanol, Äthan und wäßrigem Aceton, unlöslich in Kohlenwasserstoffen [75]. Das berechnete Molekulargewicht (372) stimmt mit dem kryoskopisch ermittelten gut überein [79]. Das Dihydrochlorid zeigt IR-Banden bei 3,6 und 9,0 μ . Das freie Toxin ist eine zweisäurige Base mit pK_a -Werten von 8,1 und 11,5. Mit aromatischen Nitroverbindungen ergibt Mytilotoxin ähnliche Farbreaktionen wie Kreatinin, mit dem es vermutlich verwandt ist. Der Kreatinin-Test ist zur quantitativen Bestimmung des Giftes in den Muscheln empfohlen worden. Reaktionen auf die Guanidiniumgruppe, auf Enole von 1,3-Diketonen, auf mono- und bifunktionelle Alkohole oder Zuckergroupierungen mit reduzierender Wirkung verlaufen negativ.

Gereinigtes Mytilotoxin kann mit Wasserstoff in Gegenwart von Platinmohr reduziert und mit Luft im alkalischen Milieu oxydiert werden. Sowohl das Dihydro-Derivat als auch die oxydierte Form sind nicht toxisch.

Oxydativer und hydrolytischer Abbau liefern Guanidopropionsäure, Guanidin, Harnstoff, Ammoniak und Kohlendioxyd [70].

Mytilotoxin ist eines der stärksten in der Natur vorkommenden Gifte; die besten Präparate haben eine To-

- [72] J. M. Burke, J. Marchisotto, J. J. A. McLaughlin u. L. Provasoli, Ann. New York Acad. Sci. 90, 837 (1960).
- [73] H. Müller, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 53, 67 (1935).
- [74] W. M. Bendien u. H. Sommer, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 48, 715 (1941).
- [75] H. Sommer, R. P. Monnier, B. Riegel, D. W. Stanger, J. D. Mold, D. M. Wikholm u. E. S. Kiralis, J. Amer. chem. Soc. 70, 1015 (1948).
- [76] H. Sommer, B. Riegel, D. W. Stanger, J. D. Mold, D. M. Wikholm u. M. B. McCaughey, J. Amer. chem. Soc. 70, 1019 (1948).
- [77] B. Riegel, D. W. Stanger, D. M. Wikholm, J. D. Mold u. H. Sommer, J. biol. Chemistry 177, 1 (1949).
- [78] E. J. Schantz, J. D. Mold, D. W. Stanger, J. Shavel, F. J. Riel, J. P. Bowden, J. M. Lynch, R. S. Wyler, B. Riegel u. H. Sommer, J. Amer. chem. Soc. 79, 5230 (1957).
- [79] J. D. Mold, J. P. Bowden, D. W. Stanger, J. E. Maurer, J. M. Lynch, R. S. Wyler, E. J. Schantz u. B. Riegel, J. Amer. chem. Soc. 79, 5235 (1957).

xizität von weniger als $0,2 \gamma = 1$ ME. Ein Gegengift ist nicht bekannt. Die Wirkung wurde als curareähnlich beschrieben; doch sind Substanzen, welche die Wirkung von Curare aufheben, gegenüber Mytilotoxin unwirksam. Umgekehrt ist das Gift kein Inhibitor für Cholinesterase. Es zeigt keinen Effekt auf die Kontraktion von Muskelfasern in vitro in Gegenwart von ATP und Magnesium-Ionen, auf den Sauerstoffverbrauch von Geweben und auf die enzymatischen Vorgänge, welche die Umwandlung von ADP in ATP im Muskel veranlassen.

Gifte aus verschiedenen Muschelsorten sind sehr ähnlich oder sogar identisch. Die Gleichwertigkeit des Mytilotoxins mit dem aus Kulturen von *Gonyaulax catenella* extrahierten Stoff [72] bestätigt die Hypothese über den Ursprung des Muschelgiftes. Schantz [70] hat aber darauf hingewiesen, daß andere Bildungswege für das Gift in Muscheln nicht völlig auszuschließen sind.

6. Tetrodotoxin [*]

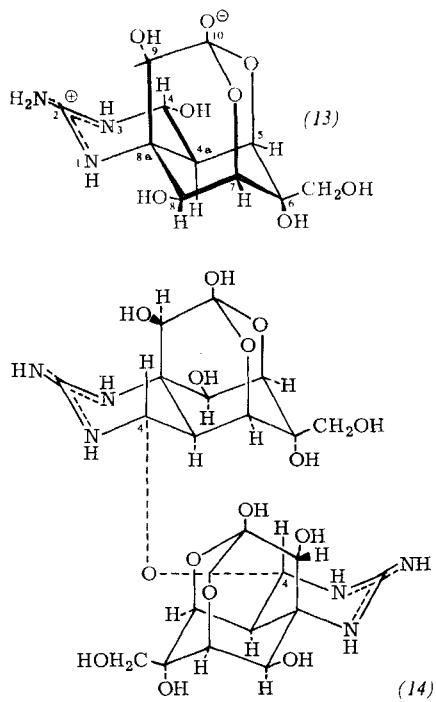
Ichthyosarcotoxismus nennt man Vergiftungen, die nach dem Genuss gewisser Fische, z. B. *Gymnothorax* (einige Muränen-Arten), *Scombroidei* (makrelenartige Fische), *Ciguatera* (einige Fischsorten aus der Karibischen See, dem Pazifischen und Indischen Ozean) sowie *Tetraodon* (zahlreiche Arten von Kugelfischen, zumeist in tropischen Gewässern) auftreten [80]. Tarichatoxin aus dem Wassermolch *Taricha torosa* und Tetrodotoxin sind identisch [81].

Die extrem starke Giftigkeit von Kugelfischen ist in Japan seit langem bekannt [82–85]. Tsuda isolierte 1950 ein Tetrodotoxin-Präparat mit einer konstanten Toxizität von $0,01 \gamma/g$ Mäusegewicht [86–89]; Nagai [90] erhielt ein noch wirksameres Produkt (Toxizität: $0,008 \gamma/g$ Maus).

Für die Struktur von Tetrodotoxin wurde von Fischer Formel (13) vorgeschlagen [81], von Tsuda Formel (14) [91].

In Japan werden jährlich mehrere hundert tödliche Vergiftungen nach dem Genuss falsch zubereiteter Kugel-

- [*] Vgl. Angew. Chem. 76, 278 (1964); Nachr. Chem. Techn. 12, 116 (1964).
- [80] E. F. Murtha, Ann. New York Acad. Sci. 90, 820 (1960).
- [81] H. S. Mosher, F. A. Fuhrmann, H. D. Buchwald u. H. G. Fischer, Science (Washington) 144, 1100 (1964).
- [82] D. Takahashi u. Y. Inoko, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 26, 401 (1890).
- [83] Y. Tahara, Biochem. Z. 30, 255 (1910).
- [84] F. Ishihara, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 103, 211 (1924).
- [85] J. Nagai u. T. Ito, J. Biochemistry (Tokio) 30, 235 (1939).
- [86] K. Tsuda u. M. Kawamura, J. pharmac. Soc. Japan (Yakugaku-zasshi) 70, 432 (1950).
- [87] K. Tsuda u. M. Kawamura, J. pharmac. Soc. Japan (Yakugaku-zasshi) 72, 187, 771 (1952).
- [88] K. Tsuda u. M. Kawamura, Chem. pharmac. Bull. (Tokio) 1, 112 (1953).
- [89] K. Tsuda u. M. Kawamura, Chem. pharmac. Bull. (Tokio) 8, 257 (1960).
- [90] T. Nagai, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 306, 104 (1956).
- [91] K. Tsuda, R. Tachikawa, K. Sakai, C. Tamura, O. Amakasu, M. Kawamura u. S. Ikuma, Chem. pharmac. Bull. (Tokyo) 12, 642 (1964).



fische verzeichnet. Parästhesie und motorische Lähmung sind die ersten Symptome; der Tod tritt durch Lahmlegung des Atemzentrums und der Atemmuskeln, insbesondere des Zwerchfells, ein. Tetrodotoxin besitzt demnach eine curareähnliche Wirkung. Es unterdrückt die Reizleitung in motorischen und sensiblen Nerven sowie im sympathischen System und stört die Funktion zentraler Stellen im Gehirn [92–94]. Cholinacetylase [95], Acetylcholinesterase und Cytochrom-c-Oxydase werden von Tetrodotoxin noch in Konzentrationen von $4,4 \cdot 10^{-7}$, $1,3 \cdot 10^{-5}$ bzw. $0,8 \cdot 10^{-5}\%$ gehemmt.

Schlußbemerkungen

Biotoxine sind unter allen Gruppen von Meerestieren weit verbreitet. Die Verteilung zwischen den Gruppen und innerhalb der Gruppen ist jedoch sehr unregelmäßig. Nur wenige Arten von Arthropoden und Anneliden sind toxisch. Bei Mollusken, Stachelhäutern und Fischen können giftige Substanzen, die von einer Art in

[92] K. Iwakawa u. S. Kimura, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 93, 305 (1922).

[93] J. Yano, Japan J. med. Sci. 5, 99 (1938).

[94] K. Kuriaki, K. Kiyoshi u. Y. Mochizuki, Jap. J. Pharmacol. 6, 37 (1956).

großer Menge produziert werden, bei nahe verwandten Organismen vollständig fehlen. Das Vorkommen der Biotoxine zeigt also keine stammesmäßigen Zusammenhänge. Die Verteilung toxischer Stoffe bei Meerestieren hängt vielleicht von den Umweltbedingungen ab.

Einige Toxine werden in Sekreten vieler Arten ange troffen, andere Toxine sind auf eine einzige Gruppe oder auf nur wenige Vertreter innerhalb einer Gruppe beschränkt. Tetramin kommt sowohl in den Cnidoblasten von Coelenteraten als auch in den Giftdrüsen von Gastropoden vor. 5-Hydroxy-tryptamin wurde zwar in fast allen bisher untersuchten Arten angetroffen, aber nur in toxischen Sekreten einiger Arten von Cephalopoden und im Hohlraumgewebe der See anemone ist es in größerer Menge vorhanden. Bei den Kopffüßlern finden sich große Unterschiede zwischen nahe verwandten Arten: Während die rückwärtigen Speicheldrüsen von *Octopus vulgaris* zu den besten Quellen für 5-Hydroxy-tryptamin zählen, fehlt diese Substanz vollkommen in den gleichen Organen von *Octopus macropus* und *Sepia officinalis*. Murexin, Seneciolykholin und Acrylkholin sind auf wenige Arten mariner Gastropoden beschränkt. Holothurin ist typisch für einige Seegurken-Arten; aber nicht alle Holothurien, die das Cuviersche Organ besitzen, produzieren auch Holothurin. Das Polypeptid Eledoisin schließlich wurde bisher nur in der Gattung *Eledone* gefunden. Toxische Proteine sind in den Cnidoblasten von Coelenteraten [96], in den Giftsekreten von Cephalopoden [97] sowie im Blut und im Rückenmark einiger Fische vorhanden [98–101]. Daß das Mytilotoxin der Muscheln auf die toxische Ausscheidung von Mikroorganismen zurückzuführen ist, scheint gesichert zu sein. Es ist jedoch nicht sicher, ob die beiden Toxine chemisch gleich sind. Die chemische Identität der Toxine mehrerer Speisemuschel-Arten ist erwiesen, es gibt aber auch solche, deren Toxine offensichtlich anders zusammengesetzt sind. Wie sich das Tetrodotoxin bildet, ist noch nicht bekannt.

Eingegangen am 11. März 1964 [A 407]
Übersetzt von Dr. H. F. Ebel, Heidelberg

[95] K. Kuriaki u. H. Nagano, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 12, 393 (1957).

[96] C. E. Lane, Ann. New York Acad. Sci. 90, 742 (1960).

[97] F. Ghiretti, Nature (London) 183, 1192 (1959).

[98] F. Ghiretti u. E. Rocca, Pacific Science Congress, Honolulu (1960).

[99] E. Rocca u. F. Ghiretti, Toxicon 2, 79 (1964).

[100] P. R. Saunders, Ann. New York Acad. Sci. 90, 798 (1960).

[101] P. R. Saunders u. L. Tokes, Biochim. biophysica Acta 52, 527 (1961).