

## Zur Chemie der Schlangengifte

Von KARL SLOTTA, São Paulo, Brasilien<sup>1</sup>

Die Schlangengifte sind in bezug auf ihre physiologischen Eigenschaften weitgehend untersucht. Bei Naturstoffen, die auf Nerven, Muskeln, Zirkulation, Blut, Herz, also praktisch auf alle Teile des Körpers stärkste Wirkungen ausüben, ist das nicht verwunderlich. So hat man die Gifte der verschiedensten Schlangen auf alle möglichen Substrate, wie Eiweiss, Blutkörperchen, Azetylcholin, Adenosintriphosphat usw., einwirken lassen und ihre enzymatischen Wirkungen festgestellt. Ob es sich bei den auf diese Weise beobachteten Wirkstoffen um Enzyme im strengen Sinne des Wortes handelt, oder ob wir Toxine und Enzyme unterscheiden müssen, sei dahingestellt.

Jedenfalls sind die vielleicht wichtigsten Wirkstoffe der Schlangengifte die folgenden:

1. *Neurotoxine*, die vor allen Dingen die Atmung lähmen.
2. *Lezithinasen* oder *Hämolyse*, die aus Lezithin das Lysolezithin bilden, das die Blutkörperchen auflöst.
3. *Koaguline*, die in verschiedener Weise in das System der Blutgerinnung eingreifen.
4. *Proteasen*, die nicht nur normale Eiweisskörper abbauen, sondern von ihnen Substanzen, wie Histamin, ablösen und auch aus ihnen physiologisch hochwirksame Polypeptide abspalten (wie etwa das Bradikin), die dann Schockwirkungen auslösen.
5. *Kardiotoxine*, die den Herzmuskel zum Stillstand bringen.
6. *Hämorrhagine*, die Ödeme, Hämorrhagien und schliesslich Nekrosen bewirken.

Was nun die chemische Aufklärung der Schlangengifte angeht, so stehen wir noch vollkommen am Anfang. Wir glauben zwar heute zu wissen, dass alle diese Wirkstoffe Eiweissnatur haben. Ob aber jede der physiologisch nachgewiesenen Wirkungen einem chemisch einheitlichen Protein zukommt, ist schon sehr strittig. Weiterhin ist es bisher nur in zwei Fällen gelückt, kristallisierte, physiologisch hochaktive Proteine zu isolieren. Wenn auch die Kristallisation bei einem Eiweißstoff noch nicht den Beweis seiner Einheitlichkeit darstellt, so ist sie doch zumindest ein Schritt auf diesem Wege.

Die Schwierigkeiten der chemischen Aufklärung der Schlangengifte sind mannigfaltig. Zunächst einmal ist

es nicht leicht, genügende Mengen frischen Giftes zu erhalten, denn die oft in ziemlich roher Weise entnommenen und getrockneten Gifte sind meistens schon verändert. Dann ist die Abtrennung der einzelnen, sehr ähnlichen Eiweisskomponenten mehr eine Kunst als eine Wissenschaft.

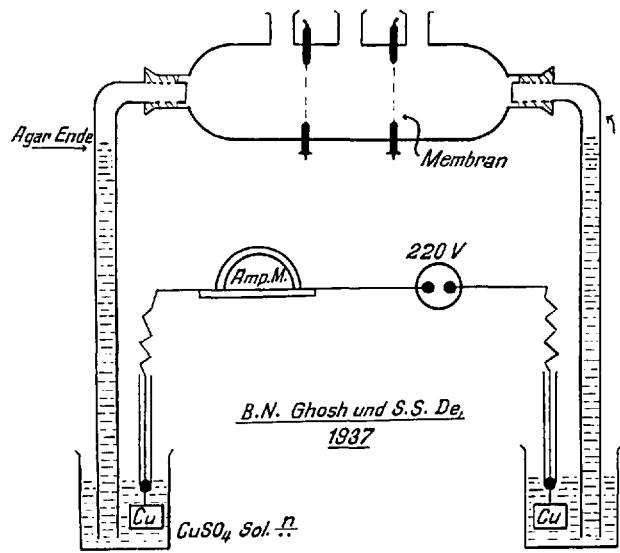


Abb. 1.

Die chemisch am besten untersuchten Schlangengifte sind die aus der Gruppe der Klapper- und der Brillenschlange, also einer Viper und einer Natter, um die biblische Bezeichnung zu gebrauchen. Die moderne zoologische Systematik hat die Einteilung und die Bezeichnungen der Gruppen, Arten und Spezies der Schlangen öfters geändert, aber man kann sagen, dass die *Klapperschlangen* (zum Beispiel *Crotalus terrificus terrificus*, das heisst die brasilianische Art) *Viperiden* (auch Crotaliden genannt) sind, die zu den Solenoglypha gehören. Diese Gruppe umfasst die Schlangen, die einen vollkommen geschlossenen Giftkanal in den mit den Giftdrüsen verbundenen Maxillarzähnen und bewegliche Fänge haben.

Die *Brillenschlangen*, das heisst vor allem die indischen *Naja*-Arten, sind *Colubriden* (auch Elapiden genannt), die zur Gruppe der Proteroglypha gehören und deren nicht bewegliche Giftzähne einen noch nicht so vollkommen geschlossenen Kanal aufweisen. In Asien wurden 27 verschiedene Gattungen (111 Spezies) von

<sup>1</sup> K. SLOTTA, Caixa Postal 4790, São Paulo (Brasil).

Colubriden gezählt, während in Amerika vor allem Viperiden mit 4 Gattungen (50 Spezies) vorkommen.

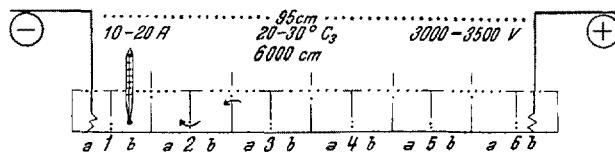
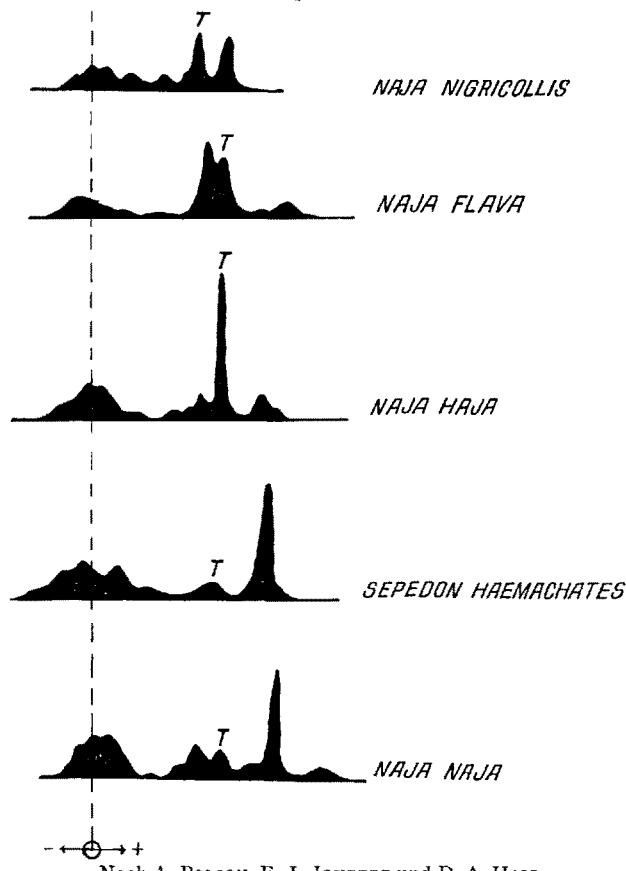


Abb. 2. F. MICHEEL, 1937.

Im übrigen hat diese Systematik, die sich auf äussere Merkmale stützt, für eine chemische Einteilung der Schlangengifte nur sehr beschränkte Bedeutung. Die Gifte der verschiedensten Giftschlangen sind wohl in ihrer physiologischen Wirkung und somit ihrer chemischen Zusammensetzung verschieden, aber es handelt sich dabei mehr um quantitative als qualitative Unterschiede.

Abb. 3. Elektrophorese der Gifte von



Nach A. POLSON, F. J. JOUBERT und D. A. HAIG.

In den Jahren vor dem Zweiten Weltkriege wurden wesentliche Trennungsergebnisse mit der *Elektrodialyse*<sup>1</sup> und *Kataphorese*<sup>2</sup>, besonders am Gift der Brillenschlange in Indien und in Deutschland, erzielt (Abb. 1 und 2).

Erst nach dem Kriege erschienen die ersten Veröffentlichungen, die die *Elektrophorese* zur Aufklärung der Gifte heranzogen. Man erhielt so zumindest ein Bild über die Zahl und die Menge der einzelnen Komponenten verschiedener Colubriden- und Viperidengifte, die bei verschiedenem pH, verschiedener Ionenstärke und Konzentration untersucht wurden. Betrachtet man die erhaltenen Diagramme verschiedener *Colubridengifte*, wie die von *Naja flava*, *Naja naja* usw., so sieht man, dass diese Gifte zum mindesten aus sieben bis acht elektrophoretisch verschiedenen Proteinen bestehen<sup>1</sup> (Abb. 3). Interessant ist dabei, dass die neurotoxische und hämolytische Wirkung immer gemeinsam bei der mit *T* bezeichneten Komponente gefunden wurde. Dasselbe konnte auch bei einem *Viperidengift*, nämlich von *Crotalus t. t.* aus Argentinien, nach elektrophoretischer Trennung festgestellt werden<sup>2</sup> (Abb. 4).

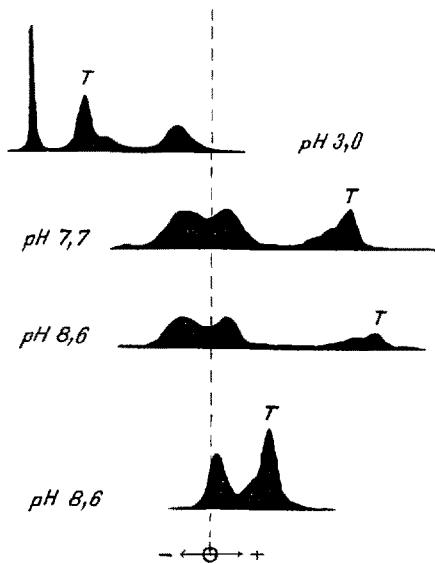


Abb. 4. Elektrophorese von Klapperschlängengift.  
Nach J. M. GONÇALVES und A. POLSON.

Eine neuere elektrophoretische Untersuchung frischen Giftes der brasilianischen Klapperschlange (*Crotalus t. t.*) zeigte auch das Vorhandensein von mindestens sieben verschiedenen Eiweisskörpern<sup>3</sup> (Abb. 5).

Die Elektrophorese ist bisher nur für die analytische Aufklärung der Schlangengifte benutzt worden. Die *präparative Trennung* der einzelnen, verschieden geladenen Eiweissubstanzen wurde bisher mit Hilfe der Elektrophorese noch nicht durchgeführt. Die bescheidenen Erfolge, die in der Isolierung einiger Giftkomponenten erzielt worden sind, verdanken wir deshalb, ausser der genannten Elektrodialyse und Kataphorese, den alten Fällungsmethoden der Eiweisschemie. So ist

<sup>1</sup> A. POLSON, F. G. JOUBERT und D. HAIG, Biochem. J. 40, 265 (1946).

<sup>2</sup> J. M. GONÇALVES und A. POLSON, Arch. Biochem. 13, 253 (1947).

<sup>3</sup> Für die Durchführung dieser Versuche bin ich G. HÖXTER, Instituto Butantan, São Paulo, dankbar.

<sup>1</sup> B. N. GHOSH und S. S. DE, Ind. J. Med. Res. 24, 1175 (1937).  
<sup>2</sup> F. MICHEEL, H. DIETRICH und G. BISCHOFF, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 249, 160 (1937).

es besonders in Indien geglückt, aus dem *Najagift vier der aktiven Substanzen* auf das 15–20fache anzureichern und eine davon in kristallisierter Form zu gewinnen.

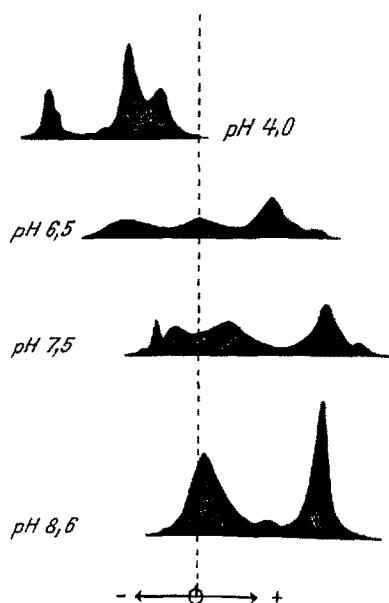


Abb. 5. Elektrophorese von Klapperschlangengift (Butantan).

Nach den erwähnten elektrophoretischen Bestimmungen schien es, als ob das atmungslähmende Neurotoxin und das Hämolsin dieser Colubridengifte chemisch dieselbe Substanz sei. Das ist aber sicher nicht der Fall. Das *Neurotoxin* der Brillenschlange ist ein *Polypeptid* vom Molekulargewicht 1500–4000<sup>1</sup> und einem isoelektrischen Punkt nahe pH = 11<sup>2</sup>. Es gibt ein Pikrat und Hydrochlorid<sup>3</sup>. Man wäre geneigt, es als ein Histon bzw. Protamin anzusehen, wenn es sich nicht von solchen Stoffen grundlegend durch seinen hohen Zystingehalt von 20,6%<sup>1</sup> untersiede, worauf noch zurückzukommen ist. Auffallend ist, dass die in ihm vorhandenen Mengen der drei Diaminosäuren Histidin, Lysin und Arginin im Verhältnis von 1:2:4 stehen sollen, wie es auch für das Thymushistone gefunden wurde<sup>4</sup>.

Nun ist ja bekannt, dass Protamine und Proteine mit saurem isoelektrischem Punkt salzartige Verbindungen eingehen können. So bildet Insulin (i.P. = 5,3) mit Protaminen (i.P. = 12), im Verhältnis von 1:10 vermischt, eine Verbindung, deren i.P. bei 7,2 liegt<sup>5</sup>. Etwas Ähnliches könnte zwischen dem kleinmolekularen, stark basischen Neurotoxin des Najagiftes und dem viel höhermolekularen, saureren Hämolsin vor-

liegen. Nur ist der saurere Charakter des Hämolsins nicht so stark ausgeprägt wie der des Insulins, und wohl deshalb gelingt es verhältnismässig leicht, in schwach saurer Lösung (pH = 2,8–5,8) mit Fällungen durch Natriumchlorid und -sulfat oder Ammoniumsulfat in der Nähe der Halbsättigung Neurotoxin vom Hämolsin zu trennen.

Das *Hämolsin* fällt aus, während das kleine, basischere Neurotoxin in Lösung bleibt. Weitere Reinigung wird dann durch Adsorptionsverfahren und Kataphorese erzielt, bis das *Neurotoxin* fast rein und im Vergleich mit dem Rohgift 17mal so giftig vorliegt. Es ist wichtig, festzustellen, dass in zwei vollkommen getrennten Arbeitskreisen, in Deutschland<sup>1</sup> und in Indien<sup>2</sup>, ungefähr dieselbe Anreicherung erzielt worden ist, ohne dass dieses *Polypeptid* zur Kristallisation gebracht werden konnte.

Dies ist nur bei der *Lezithinase* (= *Hämolsin*) des Najagiftes geglückt, die vor 11 Jahren erstmals in feinen, spitzen Nadelchen erhalten wurde<sup>3</sup>. Das Molekulargewicht wurde zu 31900<sup>4</sup>, der i.P. zu 8,55 bzw. 8,61<sup>5</sup> bestimmt. Aus dem Gift zweier verschiedener Abarten der *Naja naja* (oder, wie sie auch heißt, *Naja tripunktata*) hergestellt, besassen diese Kristalle dieselbe hämolytische Wirksamkeit von 3360 Lezithinaseeinheiten je Milligramm, während die Hämolsinkristalle aus dem Gift einer anderen indischen Schlange (*Bungarus fasciatus*) nur genau die Hälfte der Wirksamkeit besassen<sup>6</sup>. Zum Vergleich sei gesagt, dass das Neurotoxin vom *Crotalus t.t.* nur 133 Lezithinaseeinheiten besitzt.

Die *Gesamtanalyse* des kristallisierten Hämolsins aus Najagift erscheint der des kristallisierten Crotoxins sehr ähnlich:

	Crot toxin	Hämolsin
C. . . . . . . . . . . .	50,71%	48,66%
H . . . . . . . . . . . .	6,41%	6,21%
N . . . . . . . . . . . .	15,86%	15,92%
S . . . . . . . . . . . .	4,03%	3,88%
Molekulargewicht . . . .	30 000	35 200
Isoelektrischer Punkt . .	4,71	8,55–8,61
Zystin . . . . . . . . . .	13,20	11,60
Methionin . . . . . . . .	1,36	3,62
Tyrosin . . . . . . . . . .	12,00	4,34
Tryptophan . . . . . . . .	2,70	1,81

Auf Grund einer quantitativen Bestimmung der im Hämolsin enthaltenen Aminosäuren soll es aus 36 Arginin-, 32 Zystein- (?), 24 Histidin-, 12 Lysin-, 8

<sup>1</sup> F. MICHEEL und F. JUNG, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 239, 217 (1936).

<sup>2</sup> B. N. GHOSH und S. S. DE, Ind. J. Med. Res. 24, 1175 (1937).

<sup>3</sup> H. WIELAND und W. KONZ, Sitz.-Ber. der Bayr. Akad. Wiss. 1936, S. 177.

<sup>4</sup> B. N. GHOSH und D. K. CHAUDHURI, J. Indian Chem. Soc. 20, 22 (1943).

<sup>5</sup> H. HAGEBORN und Mitarbeiter, J. Amer. Med. Assoc. 106, 177 (1936).

<sup>1</sup> F. MICHEEL, H. DIETRICH und G. BISCHOFF, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 249, 160 (1937).

<sup>2</sup> B. N. GHOSH und S. S. DE, Ind. J. Med. Res. 25, 770 (1938).

<sup>3</sup> S. S. DE, Sci. a. Culture 6, 675 (1941).

<sup>4</sup> S. S. DE, J. Indian Chem. Soc. 21, 307 (1944).

<sup>5</sup> S. S. DE, J. Indian Chem. Soc. 21, 292 (1944).

<sup>6</sup> S. S. DE, Ann. Biochem. Exp. Med. 2, 237 (1942).

Methionin-, 8 Tyrosin- und 3 Tryptophanresten aufgebaut sein. Auf die Angabe des Zystin- bzw. Zysteingehalts<sup>1</sup> wird noch zurückzukommen sein.

Weniger als über das Neurotoxin und Hämolsin ist bisher über die Chemie des *Kardiotoxins* und der *Cholinesterase* aus diesen Najagiften bekannt, die beide auch aufs 15–20fache angereichert werden konnten. Vom Kardiotoxin wurde das Molekulgewicht zu 46200<sup>2</sup> und der i.P. zu 8,2<sup>3</sup> bestimmt und seine Empfindlichkeit gegen Ultraviolettbestrahlung festgestellt<sup>4</sup>. Die Cholinesterase hat einen i.P. von 5,55 bis 5,90<sup>5</sup>, stellt also den von vier bekannten Substanzen der Colubridengifte die sauerste dar.

Die indischen Autoren haben sich aber nicht nur mit den Colubridengiften beschäftigt, sondern auch das Gift der dort häufigen Viper, der *Russel-Viper* oder *Daboia*, untersucht. Es gelang ihnen, das Koagulin, eine nur in Vipergiften in grösserer Menge vorkommende Komponente, abzutrennen. Als sie das Gift bei pH = 5 der Elektrodialyse unterwarfen, reicherte es sich im Anodenraum an<sup>6</sup>. Die Reinigung des *Neurotoxins* aus demselben Gift bis auf das 7–8fache ergab eine Substanz, die einen i.P. von 5,8 bis 5,9 hatte<sup>7</sup> und außer der neurotoxischen noch hämolytische Eigenschaften besass<sup>8</sup>.

Obgleich es in Brasilien besonders viel Viperarten gibt, ist über die Chemie ihrer Gifte noch fast gar nichts bekannt. Besonders gilt das leider von dem Gift der in Brasilien häufigsten Schlangen, der *Bothrops*-arten, die auch, ebenso wie die *Crotalus*-arten, *Solenoglypha* sind. Da die proteolytische und koagulierende Wirkung dieser Gifte parallel läuft, ist aus neueren Arbeiten sehr wahrscheinlich gemacht, dass diese beiden Wirkungen von demselben Protein ausgeübt werden<sup>9</sup>. Aber die chemische Isolierung dieser oder anderer Komponenten ist bisher kaum ernsthaft versucht worden. Das wird verständlich, wenn man berücksichtigt, dass durch Elektrophorese im Gift von *Bothrops jararaca* 11 verschiedene Eiweisskomponenten festgestellt wurden, während das Gift von *Crotalus t.t.* «nur» 7 zu enthalten scheint<sup>10</sup>.

Das *Klapperschlangengift* ist also ein verhältnismässig einfaches Gemisch von Proteinen und Polypeptiden, und das ist wohl mit ein Grund dafür, dass wir über das Gift von *Crotalus t.t.* schon erheblich bes-

ser Bescheid wissen. Auch dieses Viperidengift besitzt eine Komponente, die wir *Koagulin* nennen, die sowohl koagulierend wie proteolytisch wirkt. Koagulin besitzt *Albumincharakter* und konnte aufs 10fache gegenüber dem Rohgift angereichert, aber bisher nicht kristallisiert werden<sup>1</sup>.

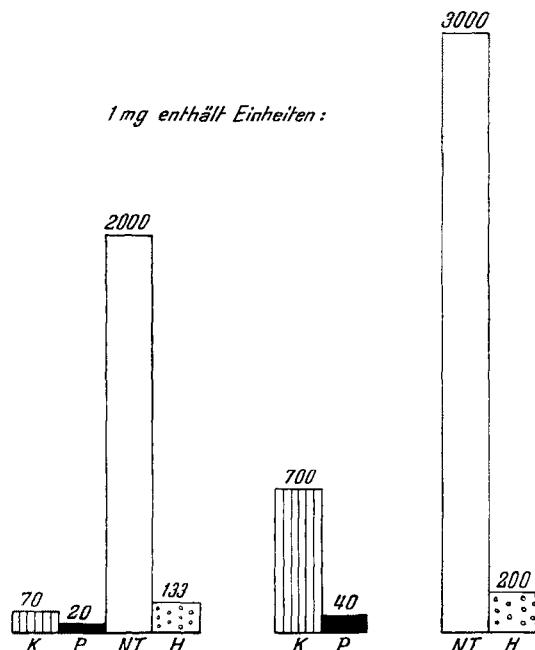


Abb. 6.

*Crotalus-t.-t.-Gift*  
(getrocknetes, rohes  
Klapperschlangengift)

*K* = Koagulase-, *P* = proteolytische, *NT* = neurotoxische,  
*H* = hämolysische oder Lezithinaseeinheiten.

(Zur Definition siehe: K. SLOTTA und G. SZYSZKA, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 258 [1938].)

Dies gelang nur mit einer zweiten Komponente, die die neurotoxische und hämolytische Aktivität des Rohgiftes in sich vereinigt, dem *Crotoxin*. Dieses *globulinähnliche Protein* kristallisiert bei Halb- bis Zweidrittelsättigung (Abb. 6), mit Ammoniumsulfat aus der durch Hitzekoagulation von unwirksamen Bestandteilen befreiten Lösung in schönen, quadratischen Plättchen aus (Abb. 7). Es besitzt ein Molekulgewicht von 30000, einen i.P. von 4,71 und ist neurotoxisch und hämolytisch nur 50% wirksamer als das rohe Gift<sup>2</sup>. Das erscheint besonders wichtig im Hinblick auf die Tatsache, dass sich fast alle anderen chemisch bearbeiteten Komponenten aus diesen und anderen Schlangengiften aufs 10–20fache anreichern liessen. Das *Crotoxin* ist also nicht nur die für die Wirkung des Giftes ausschlaggebende, sondern auch mengenmäßig die Hauptkomponente des Klapperschlangengiftes.

Durch Papierchromatographie seines Hydrolysates wurde festgestellt, dass es aus 18 Aminosäuren zu-

<sup>1</sup> S. S. DE, J. Indian Chem. Soc. 22, 10 (1944).

<sup>2</sup> N. K. SARKAR, J. Indian Chem. Soc. 24, 61 (1947).

<sup>3</sup> N. K. SARKAR, J. Indian Chem. Soc. 24, 227 (1947).

<sup>4</sup> N. K. SARKAR und S. R. MAITRA, Ann. Biochem. Exp. Med. 46, 87 (1946).

<sup>5</sup> D. K. CHAUDHURI, Sci. a. Culture 8, 5, 1942 (1944); Ann. Biochem. Exp. Med. 6, 9 (1946).

<sup>6</sup> B. N. GHOSH, S. S. DE und P. R. RAY, Sci. a. Culture 4, 738 (1939).

<sup>7</sup> B. N. GHOSH und S. S. DE, Sci. a. Culture 3, 297 (1937).

<sup>8</sup> B. N. GHOSH, S. S. DE und D. P. BHATTACHARJEE, Indian J. Med. Res. 26, 753 (1939).

<sup>9</sup> B. JANSZKY, Anais do Instituto Pinheiros 14, 51 (1951).

<sup>10</sup> Nach HÖXTER und MUNGOLI, zitiert von W. H. A. SCHÖTTLER, Bull. World Health Organ. 5, 294 (1952).

<sup>1</sup> K. SLOTTA und H. FRAENKEL-CONRAT, Nature 142, 213 (1938).

<sup>2</sup> K. SLOTTA und H. FRAENKEL-CONRAT, Memorias do Instituto Butantan 12, 505 (1938).



Abb. 7.

sammengesetzt ist. Es war dazu nötig, besondere Verfahren für den Nachweis des Histidins, Valins und der beiden Leuzine anzuwenden<sup>1</sup> (Abb. 8). Von allen 18 Aminosäuren sind bisher nur Zystin zu 13,2% und Methionin zu 1,36% quantitativ genau<sup>2</sup> und Tyrosin zu

12,0% und Tryptophan zu 2,7% mit einiger Sicherheit bestimmt worden<sup>1</sup>.

Schon bald nach der Entdeckung des Crotoxins zeigte sich, dass die -S-S-Bindungen in den Zystinmolekülen des Crotoxins von ausschlaggebender Wichtigkeit für seine Wirksamkeit sind. Neuerdings wurde eine weitere, sehr bemerkenswerte Tatsache gefunden: Die neurotoxische Wirksamkeit des Crotoxins wird stark vermindert, wenn man durch chemische Reagenzien einen wesentlichen Teil der aromatischen oder aliphatischen Hydroxyl-, Karboxyl-, Imidazol-, Indol-, Amino-, Amido- oder Guanidylgruppen verändert<sup>2</sup>. Crotoxin ist von allen auf diese Weise bisher untersuchten physiologisch aktiven Proteinen das *empfindlichste*. Lässt man zum Beispiel Jod oder Formaldehyd unter gleichen Bedingungen auf Insulin und Crotoxin einwirken, so sinkt die Aktivität des Insulins nur etwas, während die neurotoxische Wirkung des Crotoxins schon verschwunden ist.

Ist dieses so empfindliche Molekül nun aber wirklich eine chemisch reine Substanz? Die Fällung mit *Ammonsulfat* in steigenden Sättigungsgraden spricht dafür. Als die in Lösung bleibenden Proteinmengen gegen den Sättigungsgrad von Ammonsulfat in ein Koordinatensystem eingetragen wurden, ergab sich im Versuch mit kristallisiertem Crotoxin eine Gerade<sup>3</sup> (Abb. 9).

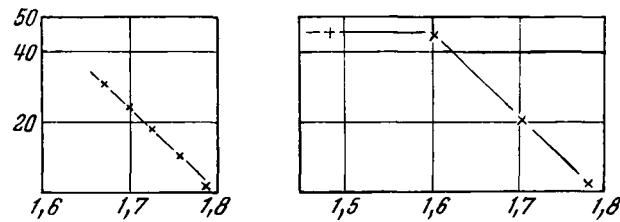


Abb. 9. Ammoniumsulfatfällung von Crotoxin. Abszissen:  $\log$  des Sättigungsgrades an Ammoniumsulfat in Prozenten der Vollsättigung ausgedrückt. Ordinaten: Milligramm Crotoxin in Lösung.

Mit der *Ultrazentrifuge*<sup>4</sup> und durch *Elektrophorese*<sup>5</sup> wurde Einheitlichkeit festgestellt. Also alle drei Kriterien, die man normalerweise für die Bestimmung der Einheitlichkeit von Proteinen anwendet, gaben ein positives Resultat.

Nur zwei indische Autoren zweifelten<sup>6</sup>. Sie sättigten bei  $pH = 7,0-7,2$  eine Lösung von Crotalusgift mit Kochsalz und liessen sie über Nacht bei  $6^\circ$  stehen. Der Niederschlag enthielt dann 8–10% der anfänglichen hämolytischen und nur 2–2,5% der toxischen Aktivi-

<sup>1</sup> H. und J. FRAENKEL-CONRAT, Biochim. Biophys. Acta 5, 98 (1950).

<sup>2</sup> H. und J. FRAENKEL-CONRAT, Biochim. Biophys. Acta 5, 98 (1950).

<sup>3</sup> K. SLOTTA und H. FRAENKEL-CONRAT, Memorias do Instituto Butantan 12, 505 (1938).

<sup>4</sup> N. GRALEN und THE SVEDBERG, Biochem. J. 32, 1375 (1938).

<sup>5</sup> CH. H. LI und H. FRAENKEL-CONRAT, J. Amer. Chem. Soc. 64, 1586 (1942).

<sup>6</sup> B. N. GHOSH und S. S. DE, Nature 143, 380 (1939).

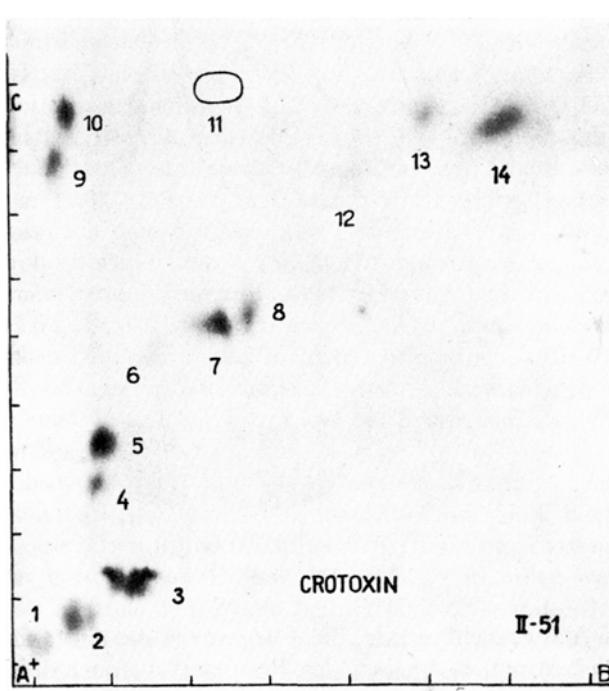


Abb. 8. Zweidimensionales Chromatogramm von 350  $\gamma$  Crotoxinhydrolysat, bei + auf Whatmanpapier Nr. I aufgetragen.

In Richtung A → B mit Butylalkohol + Essigsäure,  
In Richtung A → C mit Phenol + Wasser chromatographiert.  
Mit Ninhydrin entwickelt.

<sup>1</sup> Zystin, <sup>2</sup> Asparginsäure, <sup>3</sup> Glutaminsäure, <sup>4</sup> Serin, <sup>5</sup> Glykokoll,  
<sup>6</sup> Threonin, <sup>7</sup> Alanin, <sup>8</sup> Tyrosin, <sup>9</sup> Lysin, <sup>10</sup> Arginin, <sup>11</sup> Prolin, <sup>12</sup>  
Valin + Methionin, <sup>13</sup> Phenylalanin, <sup>14</sup> Leuzin + Isoleuzin.

<sup>1</sup> K. SLOTTA und J. PRIMOSIGH, Memorias do Instituto Butantan 23, 51 (1951).

<sup>2</sup> K. SLOTTA und W. FORSTER, Memorias do Instituto Butantan 12, 513 (1938).

tät. Also ist vielleicht das niedrigmolekulare Neurotoxin fast vollständig in Lösung geblieben, während das hochmolekulare Hämolsin zu 10% ausfiel? Man muss zugeben, dass der einmalige, vor 13 Jahren gemachte Versuch nicht sehr überzeugend ist, aber er gibt trotz seiner Primitivität doch zu denken.

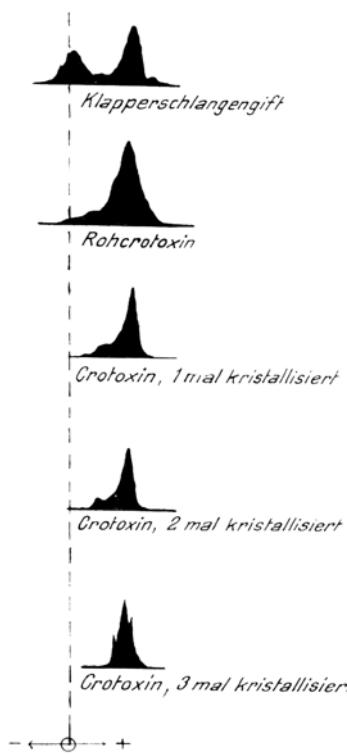


Abb. 10. Elektrophorese von Crotoxin pH 6,0 (Butantan).

Neuere Methoden ergaben nun folgendes: Wenn man Crotoxin der chromatographischen Verteilung mit Cellosolve-Ammonsulfat-Wasser auf «Hyflo» unterwirft, so bekommt man für das amorphe Crotoxin eine Kurve, die auf drei Substanzen schliessen lässt, während die Kurve des kristallisierten Crotoxins manchmal klarer, manchmal weniger klar einen Doppelbuckel erkennen lässt<sup>1</sup>. Alle Fraktionen des Giftes werden bei diesem milden Verfahren schon ganz ungiftig und zum Teil unlöslich.

Vor kurzem wurde frisch hergestelltes und kristallisiertes Crotoxin mehrfach, ebenso wie früher, umgelöst. Dies geschah durch Aufnehmen des Proteins in einprozentiger Essigsäure bei 55° und Versetzen der Lösung mit einprozentigem Pyridin, so dass die Lösung dann dem pH des i.P. = 4,71 möglichst nahe kommt. Nach jedem Umlösen wurde das Crotoxin bei pH = 6 der *Elektrophorese* unterworfen, und es ergab sich, dass die erhaltenen Kurven immer weniger der Gaußschen

nahe kamen, je öfter das Crotoxin umgelöst worden war<sup>1</sup> (Abb. 10).

Nun wurden mit demselben, zweimal umgelösten Crotoxin in einer anderen Apparatur bei höherem pH (= 6,9) Kurven erhalten (Abb. 11), aus denen man auf die Einheitlichkeit dieses Proteins schliessen kann<sup>2</sup>.

Aber die öfters bei pH = 6,0 durchgeföhrten Elektrophoreseversuche, die deutlich auf eine, wenn auch geringfügige, Spaltung des Moleküls hindeuten, legen – besonders auch im Hinblick auf die bei Najagift gefundenen und vorher erwähnten Tatsachen – folgenden Gedanken sehr nahe: Sollte nicht schon in ganz schwach saurer Lösung zu einem vielleicht sehr kleinen Teil eine langsame Abspaltung von gewissen Polypeptidgruppen stattfinden? Ist das Crotoxin vielleicht die gut kristallisierende, salzartige Verbindung eines sauren Proteins, des Hämolsins, mit mehreren basischen Polypeptidgruppen, denen die neurotoxische Wirksamkeit zu kommt?

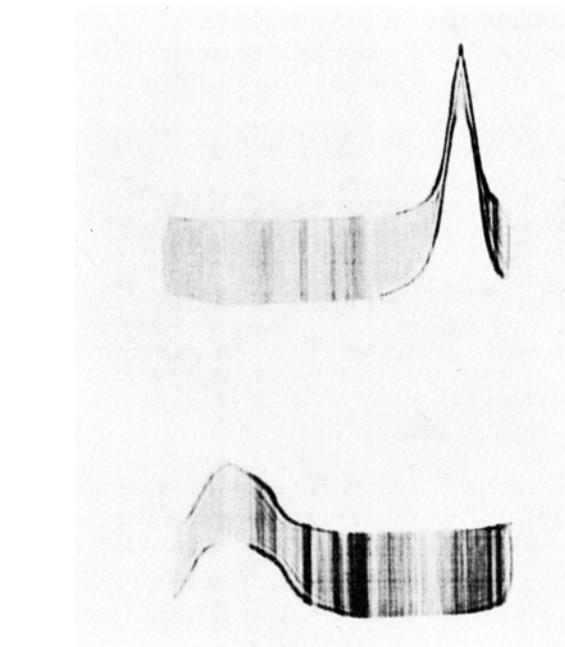


Abb. 11.

Als versucht wurde, die *Endgruppen* des Crotoxins zu bestimmen, ergaben sich Resultate, die auch dafür sprechen, dass Crotoxin aus zwei Proteinarten zusammengesetzt ist. Mit Fluordinitrobenzol behandelt, wurde ein wasserunlösliches und ein wasserlösliches Dinitrobenzolderivat im ungefähren Verhältnis von 2/3: 1/3 erhalten. Sie wurden gesondert hydrolysiert und die durch Dinitrobenzol substituierten Aminosäuren quantitativ bestimmt. Aus dem unlöslichen Produkt wurde mehr als doppelt soviel Lysin gefasst als aus dem lös-

<sup>1</sup> Nach einer persönlichen Mitteilung von H. FRAENKEL-CONRAT, der die Methode von A. J. P. MARTIN und R. R. PORTER, Biochem. J. 49, 215 (1951), benutzte.

<sup>2</sup> Für die Durchführung dieser Versuche bin ich G. HÖXTER, Instituto Butantan, São Paulo, dankbar.

<sup>2</sup> Ich danke CH. H. LI für die freundliche Übermittlung seiner Versuche und deren Interpretierung.

lichen. Lysin ist natürlich nicht endständig. Als endständige Aminosäuren wurden kleine Mengen einer noch nicht definierten Aminosäure und Serin gefunden<sup>1</sup>. Vorläufig kann man sich aus diesen Ergebnissen noch kein Bild machen. Fest steht nur, dass durch diese Umsetzung aus Crotoxin zwei sehr verschiedene Substanzen gebildet werden, die, wie zu erwarten, beide physiologisch inaktiv sind.

Immer wieder sehen wir, wie leicht es ist, die Aktivität dieser physiologisch so hoch aktiven Proteine, besonders die des Crotoxins, zu zerstören. Es erhebt sich aber auch immer wieder die noch interessantere Frage, warum ein solches Eiweissmolekül überhaupt so giftig ist. Das Gesamtprotein, nur aus den bekannten Aminosäuren aufgebaut, ist für die Wirkung wichtig; weder seine Proteinbindungen noch seine sauren, neutralen oder basischen Seitengruppen dürfen geschädigt werden<sup>2</sup>. Aber das erklärt noch nicht unsere Hauptfrage. Sehr wahrscheinlich sind es die Schwefelbindungen, die in bestimmter Stellung und Oxydationsstufe diese physiologisch starke Wirkung ausüben.

In den Schlangengiften hat man nur zwei schwefelhaltige Aminosäuren gefunden: Zystin (bzw. Zystein) und Methionin. Im Crotoxin wurden 94,8% des Gesamtschwefels als 13,2% Zystin und 1,36% Methionin erfasst. Eine neurotoxisch vollwirksame Fraktion aus BothropsGift enthielt 5,73% Zystin und 1,08% Methionin, womit sich der Schwefelgehalt vollständig deckt<sup>3</sup>. Im kristallisierten Hämolsin aus Najagift wurden 11,6% Zystein und 3,62% Methionin gefunden, was nach dem festgestellten Gesamtschwefel (3,88%) zu hoch wäre<sup>4</sup> und sich nicht mit den Angaben deckt, wonach im Najarohgift aller Schwefel in Form von 13,6% Zystin gefunden wurde<sup>5</sup>. Aber diese analytischen Differenzen sind nicht das Wesentliche. Für die physiologische Wirksamkeit scheint am wichtigsten, wieviel, in welcher Form und wo Zystin und Zystein im Molekül eingebaut sind.

Nach FOLIN mit Phosphorwolframsäure, nach SULLIVAN mit Naphthochinonsulfosäure und nach BÄRNSTEIN mit Jod bestimmen wir direkt nur Zystein, das entweder im Protein als solches vorhanden war oder erst aus dem Zystin bei der Hydrolyse mit Salzsäure und Ameisensäure bzw. mit Jodwasserstoff gebildet wurde. Da in den Schlangengiften die Reaktionen mit Nitroprussidnatrium und Phosphorwolframsäure negativ ausfallen, so liegt es zunächst nahe, das in den Hydrolysaten gefundene Zystein als den Gehalt der Gifte an Zystin anzunehmen. Es wäre natürlich

aber auch möglich, dass dieses Zystein nur zum Teil aus dem Zystin des Proteins entstanden ist und dass im Gift schon gewisse Mengen als Zystein vorgelegen haben.

Wir müssen heute in den Proteinen «leicht reagierende» Thiolgruppen, die mit Natriumnitroprussid und Ferrizyanid ohne weiteres reagieren, von anderen unterscheiden, die wir «träge» nennen wollen. Diese reagieren nicht damit, aber zum Beispiel mit Jod. Außerdem existieren noch «maskierte» Thiole, die erst reagieren, wenn die Wasserstoffbindungen in dem Protein zerrissen werden, wie es bei der Denaturierung geschieht. Im Hämolsin aus Najagift scheinen sehr viele leicht reagierende Thiolgruppen vorzuliegen, denn mit Jod, Wasserstoffsperoxyd und Ferrizyanid tritt Inaktivierung ein, die mit Schwefelwasserstoff und Natriumzyanid wieder rückgängig gemacht werden kann<sup>1</sup>. Ob im Neurotoxin aus Najagift neben -S-S-Brücken auch «träge» und «maskierte» Thiolgruppen vorhanden sind, kann man wohl noch nicht sicher sagen. Im Crotoxin scheinen sie keinesfalls vorhanden zu sein. Die irreversible Inaktivierung des Hämolsins und auch des Kardiotoxins durch Ultraviolettbestrahlung beruht dagegen wahrscheinlich auf noch anderen Schädigungen dieser Proteine<sup>2</sup>.

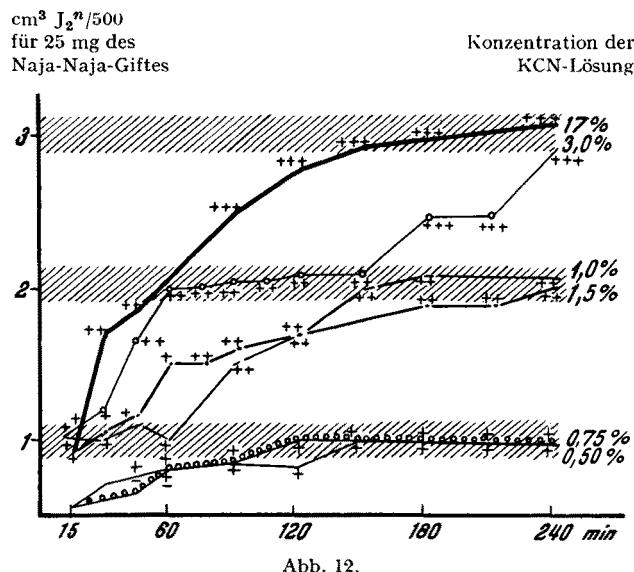


Abb. 12.

Sicher ist, dass nicht nur die Thiolgruppen in physiologisch wirksamen Proteinen, sondern auch die -S-S-Brücken außerordentlich verschiedene Reaktionsfähigkeit haben. Diese -S-S-Brücken reagieren im Crotalusrohgift sehr leicht: Mit der 20fachen Menge Zystein bei  $\text{pH} = 7,6$  wird die Giftigkeit bei Zimmertemperatur innerhalb von 24 h zum grössten Teil beseitigt<sup>3</sup>, während im gleichartigen Versuch die Giftig-

<sup>1</sup> Nach einer persönlichen Mitteilung von H. FRAENKEL-CONRAT, der die Methode von A. J. P. MARTIN und R. R. PORTER, Biochem. J. 49, 215 (1951), benutzte.

<sup>2</sup> H. und J. FRAENKEL-CONRAT, Biochim. Biophys. Acta 5, 98 (1950).

<sup>3</sup> K. SLOTTA und W. FORSTER, Memorias do Instituto Butantan 12, 513 (1938).

<sup>4</sup> S. S. DE, J. Indian Chem. Soc. 22, 10 (1944).

<sup>5</sup> K. SLOTTA, W. FORSTER und H. FRAENKEL-CONRAT, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 1623 (1938).

<sup>1</sup> S. S. DE, Ann. Biochem. Exp. Med. 2, 237 (1942).

<sup>2</sup> N. K. SARKAR und S. R. MAITRA, Ann. Biochem. Exp. Med. 46, 87 (1946).

<sup>3</sup> K. SLOTTA und H. FRAENKEL-CONRAT, Memorias do Instituto Butantan 11, 121 (1937).

keit von Najarohgft höchstens um den vierten Teil zurückgeht<sup>1</sup>.

Vor einiger Zeit wurde sehr klar gezeigt, dass im *Najarohgft* drei Arten -S-S-Brücken verschiedener Reaktionsfähigkeit existieren. Lässt man Kaliumzyanidlösungen verschiedener Konzentration auf das Gift verschieden lange einwirken, fällt das Protein mit Ammoniumsulfat, zentrifugiert und wäscht es, dann wird es in wechselndem Grade inaktiv, und entsprechend gross ist die nachzuweisende Menge der freien Thiolgruppen<sup>2</sup> (Abb. 12).

Die Stärke der Nitroprussidreaktion – in Abbildung 12 durch +, ++, +++ angegeben – zeigt qualitativ und die Menge verbrauchten Jods quantitativ die Zunahme der entstandenen Thiolgruppen an. Man kann deutlich drei Stufen der Schädigung des Giftes nach vierstündiger Einwirkung des Zyanids unterscheiden. Die erste liegt bei Gift, das mit 0,5prozentiger Kaliumzyanidlösung behandelt wurde. Es verbraucht dann je 25 mg 1 cm<sup>3</sup> n/500 Jodlösung und hat einen 50prozentigen Aktivitätsverlust erlitten. Mit einprozentiger Zyanidlösung behandelt, ist das Gift nur noch 10% so wirksam und verbraucht 2 cm<sup>3</sup> Jodlösung. Drei- und höherprozentiges Kaliumzyanid macht es nach der gleichen Zeit vollkommen unwirksam, und es werden 3 cm<sup>3</sup> Jodlösung verbraucht.

Nun ist, wie schon ausgeführt, die Molekulgewichtsbestimmung eines solchen Polypeptids wie des *Naja*-neurotoxins nicht genau durchführbar, aber nimmt man als einen sehr wahrscheinlichen Wert dafür 3500 an und zieht die vorliegenden Schwefel- und Zystinanalysen in Betracht, so ergibt sich aus allen diesen

Versuchen, dass das Molekül dieses Toxins drei -S-S-Brücken enthält. Man kann sich vorstellen, dass durch die Zyanideinwirkung zuerst eine, dann die zweite und schliesslich die dritte dieser Brücken gesprengt und das Molekül entsprechend immer unwirksamer wird.

Die nähere Untersuchung der Thiol- und -S-S-Gruppen in den Schlangengiften und anderen Proteinen im Zusammenhang mit deren physiologischen Wirkungen ist jedenfalls eines der grundlegenden Probleme der Biochemie.

### Summary

The different snake venoms are mixtures of a large number of physiologically active proteins. So far only the venoms of the Indian cobra (*Naja naja*) and the Bazilian rattlesnake (*Crotalus t. t.*) have been investigated. The hemolytically active component of the *Naja* venom is a protein of molecular weight 33,000, which in the electrophoretic experiment moves together with the neurotoxically active principle. It was possible to separate the two substances by chemical and physical-chemical methods, to crystallize hemolysin and to purify neurotoxin to a large degree. It proved to be a strongly basic, sulphur containing polypeptid.

Rattlesnake venom contains a similar compound of a globulin character which possesses all of the hemolytic and neurotoxic activity of the crude venom. It was crystallized, named «Crot toxin» and further investigated. It is a homogeneous molecule of molecular weight 30,000, which is probably also constituted by basic polypeptid-residues and a protein. Crot toxin is composed of 18 amino acids and is much more sensitive to chemical influences than other physiologically active proteins.

The coagulating and proteolytic activities particularly characteristic of the viper venoms (*Russelviper*, *Bothrops* sp., *Crotalus t.t.*) always appear together and are liable to be qualities of another protein.

The great virulence of those protein molecules probably depends on the presence of cystin- or cysteine-residues, and on their position within the molecule.

<sup>1</sup> F. MICHEEL und H. SCHMITZ, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 703 (1938).

<sup>2</sup> G. WELLERS, Rev. canad. Biol. 8, 139 (1949).

## Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. — Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. — Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. — The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

### The Content of Certain Spherical Polyhedra for any Number of Dimensions

Consider in Euclidean  $n$ -space the set of points  $(z_1, z_2, \dots, z_n)$  satisfying

$$\sum_{k=1}^n z_k^2 = 1, \text{ and } \sum_{k=1}^n b_{ik} z_k \geq 0 \quad (i = 1, \dots, n) \quad (1)$$

[the  $n$  polynomials  $\sum_{k=1}^n b_{ik} z_k$  ( $i = 1, \dots, n$ ) being linearly independent].