

Tiergifte in der biomedizinischen Forschung

Vom Jagdgift zur neuen Schmerztherapie

ILVA PUTZIER, STEPHAN FRINGS

Die Jagdgifte der Tiere sind ein unerschöpfliches Reservoir interessanter bioaktiver Substanzen – der Toxine. Jedes Toxin erfüllt eine besondere Aufgabe bei der Jagd und sorgt entweder für Lähmung, Verkrampfung oder Verdauung des Beutetiers. Für die biologische Grundlagenforschung und für die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe sind diese spezialisierten Jagdmoleküle von großem Nutzen. In der Schmerztherapie werden sie schon erfolgreich eingesetzt.

Von im Meer lebenden Polypen, Quallen oder Kegelschnecken über Insekten wie Bienen oder Wespen bis hin zu an Land lebenden Reptilien, Amphibien, Vögeln oder Säugetieren – giftige Tiere sind in fast allen Klassen des Tierreichs vertreten [1, 6]. Abbildung 1 zeigt eine Auswahl. Gifttiere werden anhand unterschiedlicher Merkmale klassifiziert: nach ihrem Lebensraum, nach dem Bau ihrer Giftapparate oder der Beschaffenheit des Giftes, das sie produzieren und nach der Rolle, welche die Gifte in ihrem natürlichen Umfeld spielen. Wir stellen im Folgenden giftige Vertreter unterschiedlicher Tierklassen vor, beschreiben ihre „chemischen Waffen“ und erläutern einige Anwendungen biogener Gifte in der Grundlagenforschung sowie in der Entwicklung neuer medizinischer Therapieverfahren.

Warum gibt es Gifte im Tier- und Pflanzenreich? Tiere und Pflanzen leben oft eng nebeneinander in Biotopen, in denen es nur begrenzt Wasser, Nahrung, Luft, Beutetiere oder Sexualpartner gibt. Betrachtet man zum Beispiel ein Korallenriff – ein Paradebeispiel für das perfekt funktionierende Zusammenleben von Tieren und Pflanzen – sieht man eine Vielzahl von Organismen der unterschiedlichsten Klassen und Ordnungen: Die Grundstruktur, das Korallenriff, wird von Kalkskelett bildenden Polypen geformt, auf denen sich auch andere Arten von Nesseltieren oder Algen niederlassen. Viele Fische und andere marine Lebewesen müssen einem starken innerartlichen und zwischenartlichen Konkurrenzdruck widerstehen, um überleben zu können. Unentwegt findet ein Kampf um Nahrung und Ansiedlungsfläche sowie zur Abwehr von Fressfeinden und Infektionen durch Pilze oder Bakterien statt.

Neben guter Tarnung steht einigen Tieren im Riff eine Batterie hochgiftiger Substanzen zur Feindabwehr und zum Beutefang zur Verfügung. Der ständige Selektionsdruck, dem die Bewohner des dicht besiedelten Korallenriffs ausgesetzt sind, bewirkt ein unentwegtes Wettrüsten, ein Perfektionieren der eigenen chemischen Waffen, aber auch der Abwehr gegen die Gifte der anderen Bewohner. Dieses Phänomen bezeichnet man als Koevolution, ein Prozess, der im Laufe der Evolution überaus wirksame Jagdgifte, aber gleichzeitig auch verblüffende Beispiele von Schutzmechanismen gegen Gifte hervorgebracht hat.

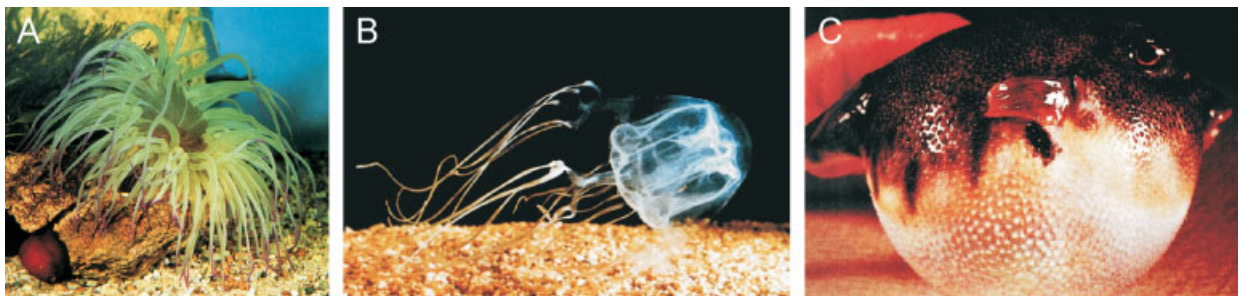


ABB. 1 (A) Die Fangarme der Seeanemone (*Anemonia sulcata*) tragen winzige Nesselzellen. (B) Die Würfelqualle (*Chironex fleckeri*) gehört zu den giftigsten Bewohnern tropischer Meere. (C) Kugelfische blasen sich bei Gefahr zu grotesker Größe auf. Zu ihrer Verteidigung setzen sie das Nervengift Tetrodotoxin ein.

Die tödliche Umarmung der Nesseltiere

Nesseltiere machen eine Vielzahl der im Riff lebenden Tiere aus. Zu dieser Klasse gehören Quallen, Korallen und auch Seeanemonen. Der Giftapparat der Nesseltiere besteht aus Nesselkapseln, die meist auf Tentakeln sitzen und bei Berührung aktiv werden, wobei sich projektilartig Widerhaken aus den Nesselzellen entladen. Diese bleiben in der Haut des Opfers stecken, während das Gift ausgeschüttet wird.

Seeanemonen bilden eine Ordnung, die nicht nur in Farbe und Erscheinungsbild vielfältig ist, sondern auch eine Vielzahl giftiger Substanzen produziert. Sie leben auf festem Meeresgrund, dem Kalkskelett einiger Korallenarten oder sitzen auf anderen Tieren, wie zum Beispiel Einsiedlerkrebsen. Seeanemonen ernähren sich sowohl von Plankton als auch von Fischen, die sie mit ihren Nesselorganen fangen. Einige Anemonenarten leben allerdings auch in Symbiose mit anderen Tieren, wie zum Beispiel den Anemonenfischen (*Amphiprion percula*). Anemonenfische schützen sich durch einen speziellen Schleim, der die Entladung der Nesselzellen verhindert. Die Fische können sich so vor Fressfeinden in die Tentakeln des Wirts zurückziehen ohne sich an den Nesselorganen zu vergiften: ein schönes Beispiel für Koevolution. Im Unterschied zu Seeanemonen, deren Tentakeln eher eine geringe Reichweite besitzen, gehen Quallen mit ihren zum Teil meterlangen, dicht mit Nesselzellen besetzten Fangarmen in allen Weltmeeren auf Beutezug. Ihre Beute, meist Planktonorganismen, aber auch kleine Fische, wird durch Nesselgift gelähmt, was das Fangen und Verspeisen erleichtert. Ihr Gift dient aber auch zum Schutz vor Fressfeinden. Geraten Menschen in die Tentakeln von Quallen der vorherrschenden Arten in Nord- und Ostsee, ruft diese Begegnung zu meist nur harmlose, lokale Hautreizungen hervor. Quallen des indopazifischen Raums, wie die Seewespe (auch Würfelqualle, *Chironex fleckeri*, Abbildung 1), dem giftigsten Meerestier überhaupt, besitzen allerdings sehr starke Nesselgifte. Sie verursachen Vergiftungssymptome, die von Ohnmacht bis zum Herzversagen reichen. Das Gift der Nesseltiere enthält Hilfsstoffe wie Enzyme, die Haut und Blut-

DAS PROBLEM DER KLEINEN MENGEN

Ein wichtiger Aspekt bei der Untersuchung von Giften biologischer Herkunft ist die Gewinnung des Giftes aus Tieren und seine Aufreinigung, also das Trennen der einzelnen Bestandteile und deren Charakterisierung [8]. Schlangen und Skorpione lassen sich relativ einfach „melken“. Schlangen werden am Kopf gepackt und dazu gebracht, ihr Gift in einen Behälter auszustoßen. Skorpione können ebenfalls leicht zum Stich gereizt und ihr Gift kann aufgefangen werden. Anders sieht das bei Seeanemonen, Fischen, Fröschen oder Kegelschnecken aus, da sie entweder keine wirklichen Giftorgane besitzen, oder weil diese zu klein sind, um einzeln entladen zu werden. Bei Fröschen beispielsweise wird deshalb nicht nur ihr Sekret gesammelt, sondern gleich die gesamte Haut, so dass man sehr viele Frösche zur Giftgewinnung töten muss. Ein Beispiel für die Schwierigkeit, die die Bestimmung einzelner aktiver Substanzen aus giftigen Tierextrakten bereitet, ist die Aufreinigung des Giftes des ecuadorianischen Baumsteigerfrosches *Epipedobates tricolor*. Nachdem J. W. Daly bereits in den siebziger Jahren festgestellt hatte, dass das Hautsekret dieses Froschs opiatähnliche Eigenschaften besitzt, sammelte er ganze 750 Froschhäute dieser Art und isolierte daraus insgesamt 60 mg Alkaloide. Nach weiteren Aufreinigungen waren aus 750 Froschhäuten gerade mal 0,75 mg einer fast reinen Substanz übrig geblieben, viel zu wenig, um mit den damaligen spektroskopischen Methoden die Struktur der gesuchten schmerzstillenden Substanz zu ermitteln. Neues Material konnte nicht mehr gewonnen werden, da die Anzahl der in Freiheit lebenden Tiere bereits stark zurückgegangen war. Deshalb musste man eine Weiterentwicklung der Messmethoden abwarten, bis Ende der 80er Jahre die Struktur des Epibatidin mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie aufgeklärt wurde. Wenn die Struktur eines für die Wissenschaft interessanten Toxins aufgeklärt ist, bemüht man sich deshalb, die Substanz synthetisch herzustellen.

zellen des Beutetieres auflösen und damit den Weg freimachen für die Hauptkomponenten der Giftgemische: hochwirksame Nerven- und Herzgifte. Zu den nachgewiesenen Giften gehören einerseits kleine Polypeptide, die auf Ionenkanäle in tierischen Membranen wirken, andererseits aber auch hämolytisch wirksame Proteine wie im Gift der Portugiesischen Galeere (*Physalia physalis*).

Die mit einem grünen Pfeil markierten Begriffe werden im Glossar erklärt.

Fugu – eine giftige Delikatesse

Ein äußerst giftiger Bewohner des Pazifiks ist der Kugelfisch (Vertreter der Familie *Tetraodontidae*) (Abbildung 1). Er zählt, anders als Seeanemonen, zu den passiv giftigen Tieren: Er setzt sein Gift Tetrodotoxin (TTX) nicht zum Beute-



(D) Das Gift der schwarzen Mamba (*Dendroaspis polylepis*) enthält gewebezerstörende Enzyme, die bei der Verdauung der Beute helfen. (E) Im Gift von Skorpionen (hier *Tityus spec.*) findet man Toxine, die eine Rolle bei der Erforschung von Ionenkanälen spielen. (F) Die Schwarze Witwe (*Latrodectus mactans*) besitzt das krampferzeugende α -Latrotoxin.

A und E: aus Teuscher und Lindequist, 1994 [9]; B, C, D und F: aus Habermehl, 1994 [1].

Tödliche Cocktails aus Toxinen

Während es in gemäßigten Zonen nur wenige landlebende Gifttiere gibt, sind tropische und subtropische Gebiete eine wahre Fundgrube. Im Regenwald spielen Gifte für das Überleben seiner Bewohner eine ähnliche Rolle wie im Korallenriff.

Schlangen gehören von jeher zu den Tieren, die dem Menschen Angst einjagen, dabei gilt nur etwa ein Fünftel der 2700 Schlangenarten als giftig. Giftschlangen bilden keine eigene Klasse, sondern es gibt in allen Familien giftige Vertreter, die auf allen Kontinenten anzutreffen sind. Besonders giftige Exemplare sind die in Asien vorkommenden Krait (*Bungarus spec.*). Durch sie geschehen viele Vergiftungen, da sie Reisfelder lieben und auch oft in menschliche Siedlungen vordringen. Ihr Gift, das Bungarotoxin, bindet spezifisch an die Azetylcholinrezeptoren der neuromuskulären Synapse und lähmt damit die Muskulatur des Beutetiers. Andere Bestandteile des Schlangengifts zerstören das Gewebe: Wer einmal gesehen hat, wie ein Arm oder Bein des Opfers der Schwarzen Mamba (*Dendroaspis polylepis*, Abbildung 1) aussieht, der weiß, woher die eigentlich grüne Schlange ihren Namen hat. Das Gift der Schwarzen Mamba enthält neben einigen Nervengiften vor allem gewebsschädigende Enzyme, die zur Verdauung des Opfers beitragen und dafür sorgen, dass die Hauptbestandteile des Giftes schnell zu ihren Bestimmungsorten gelangen. Durch die Zerstörung von Blutgefäßen färbt sich das vergiftete Gewebe schwarz. Schlangengifte sind ein gutes Beispiel dafür, dass Tiergifte ein gut abgerundeter Designercocktail von giftigen Substanzen sind. Sie sind genau abgestimmt auf ihre Funktion: die Beute rasch zu erlegen und das unzerkaut verschlungene Beutetier zu verdauen. So enthalten sie neben einigen starken Nervengiften vor allem gewebsschädigende und proteinzerstörende Toxine sowie Hemmstoffe der Blutgerinnung.

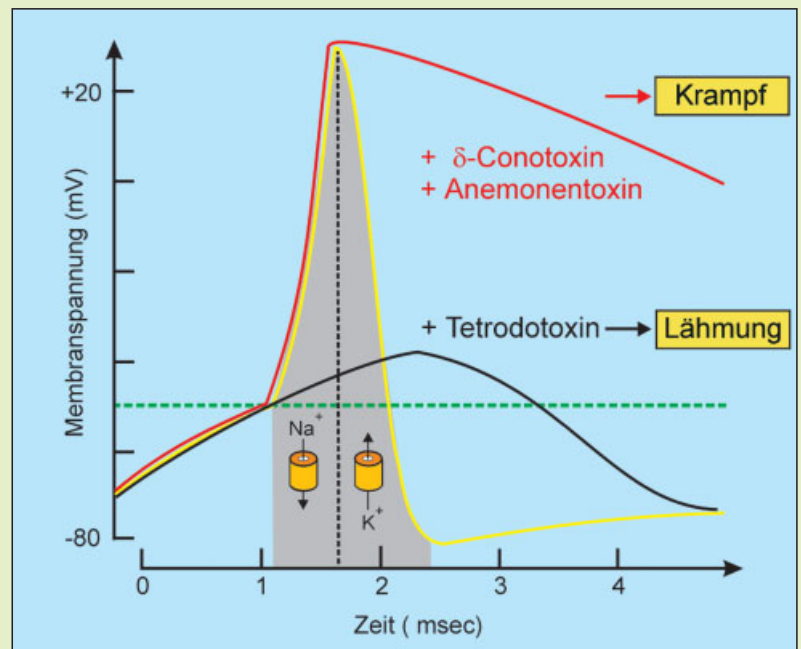
Für Toxinforscher sind neben den Giftschlangen vor allem die Skorpione der tropischen und subtropischen Regionen von besonderem Interesse (Abbildung 1). Jedoch sind nur etwa 25 von insgesamt 1500 Arten so giftig, dass sie mit ihrem Stich einen Menschen töten könnten. Besonders häufig treten Vergiftungen in Mexiko, Tunesien, Marokko und Brasilien auf. Skorpiongift ist ein Gemisch aus hochwirksamen Polypeptid-Toxinen und auch Enzymen, die hier allerdings, anders als bei Schlangengiften, eine untergeordnete Rolle spielen. Ähnlich wie bei Kegelschnecken hat sich bei Skorpionen eine enge Anpassung an den Beutetyp entwickelt: einige Gifte wirken bevorzugt auf Insekten, andere eher auf Wirbeltiere wie Schlangen und Nagetiere, aber auch auf den Menschen. Ein Hauptbestandteil des Giftes sind die α -Toxine, basische Polypeptidtoxine aus bis zu etwa 70 Aminosäuren, die durch vier Schwefelbrücken stabilisiert werden. Sie verursachen durch Daueraktivierung der Natriumkanäle erregbarer Membranen eine Verkrampfung der Muskulatur ihres Opfers (siehe Kasten rechts). Zu den vielen Toxinen der

Skorpione gehören auch Noxiustoxin und Charybdotoxin, die sehr spezifisch Kaliumkanäle blockieren.

Unter den mit den Skorpionen verwandten Spinnen findet man ebenfalls einige giftige Arten. Spinnen besitzen keinen Giftstachel, sondern beißen ihre Opfer mit kräftig ausgebildeten Mundorganen. Spinnen sind Räuber und ernähren sich hauptsächlich von Insekten. Spinnenbisse sind für Menschen normalerweise nicht tödlich, die Vergiftung verläuft aber oft sehr schmerzhaft. Einige für den Men-

TOXINE VERÄNDERN AKTIONSPOTENTIALE

Ein Aktionspotential (gelbe Linie) ist eine kurzzeitige Depolarisation der Nervenmembran, die immer dann ausgelöst wird, wenn das Membranpotential vom Ruhewert (ca. -70 mV) über einen Schwellenwert (hier -55 mV, grüne Linie) hinaus ansteigt. Das passiert zum Beispiel als Folge von Aktionspotentialen in benachbarten Ranvier-Schnürringen und ermöglicht so die Weiterleitung elektrischer Signale entlang der Faser eines Motoneurons bis zur neuromuskulären Synapse.



Bei Überschreiten der Schwellenspannung öffnen sich für kurze Zeit (etwa 1/1000 Sekunde) Natriumkanäle und leiten einen depolarisierenden Na^+ -Strom in die Zelle. Diese Depolarisation öffnet Kaliumkanäle, und der K^+ -Ausstrom bringt das Membranpotential schnell wieder auf den Ausgangswert zurück. Tetrodotoxin verhindert die Öffnung von Na^+ -Kanälen und damit die Entstehung von Aktionspotentialen. Auch beim Überschreiten der Schwellenspannung wird kein Aktionspotential ausgelöst (schwarze Linie); die Signalweiterleitung zum Muskel ist unterbrochen – die Folge ist Lähmung. Auch δ -Conotoxin und verschiedene Toxine von Seeanemonen greifen die Na^+ -Kanäle der Nervenfasern an. Allerdings verhindern diese Toxine nicht das Öffnen der Kanäle – bei Überschreiten der Schwellenspannung kommt es folglich zur Depolarisation (rote Linie); die Toxine verhindern aber das Schließen der Kanäle, und der anhaltende Na^+ -Einstrom verzögert die Repolarisation der Membran: das Aktionspotential dauert viel zu lang, die Membran wird übererregt. Durch die verlängerten Aktionspotentiale werden die Kalziumkanäle in der präsynaptischen Membran unmäßig lang geöffnet. Die Folge ist eine stark erhöhte Freisetzung von Azetylcholin und eine Übererregung der Muskelmembran – die Ursache für eine krampfartige Kontraktion des Muskels.

schen eher ungefährliche Toxine, wie Argiopin oder Argio-toxin, sind Antagonisten des Rezeptors für die Aminosäure Glutamat, den wichtigsten erregenden Neurotransmitter bei Wirbellosen. Denkt man an gefährliche Spinnen, kommt einem die Schwarze Witwe (*Latrodectus spec.*) in den Sinn – und das eindeutige Merkmal auf dem Rücken des Weibchens, eine rote, manchmal sanduhrförmige Zeichnung (Abbildung 1). Diese Spinne, die ihren Namen trägt, weil sie das Männchen nach der Begattung ermordet und frisst, wenn es nicht schnell genug das Weite sucht, besitzt ein wirksames Nervengift, das α -Latrotoxin. Zwei Arten dieses Toxins wurden im Gift der Schwarzen Witwe gefunden, das eine wirkt spezifisch auf Insekten, das andere auch auf Wirbeltiere. Beide Gifte binden an die präsynaptische Membran von Nervenzellen, was zu einer übermäßigen Ausschüttung von Neurotransmitter-Vesikeln führt.

Pfeilgiftfrösche – schön giftig

Zu den hübschesten Gifttieren gehören die Pfeilgift- oder Baumsteigerfrösche (Familie *Dendrobatidae*). Diese nur wenige (zwei bis sechs) Zentimeter großen, in den tropischen Wäldern Südamerikas heimischen Amphibien, signalisieren durch ihre auffälligen und bunten Zeichnungen höchste Giftigkeit [2]. Indianer nutzen das Hautsekret der Baumsteigerfrösche für die Herstellung von Giftpfeilen, mit denen selbst große Säugetiere erlegt werden können. Das Gift wird in Hautdrüsen produziert, die über die gesamte Körperoberfläche verteilt sind. Sie bilden dieses Sekret, um ihr wichtigstes Atmungsorgan – ihre empfindliche Haut – vor zerstörenden Mikroorganismen zu schützen. Da dieses Sekret, das vor allem verschiedene ► Alkaloide enthält, sehr bitter schmeckt, lassen potentielle Fressfeinde schnell von ihnen ab. Man hat festgestellt, dass in Terrarien gezüchtete Tiere ihre Giftigkeit verlieren, da die Frösche zur Synthese ihrer giftigen Alkaloidgemische deren Vorstufen über ihre Nahrung aufnehmen müssen. Solche Vorstufen findet man zum Beispiel in Ameisen oder anderen Insekten – typischen Beutetieren der Baumsteigerfrösche.

Meist reicht es nicht aus, mit der Haut der Frösche in Berührung zu kommen, um sich eine Vergiftung zuzufügen; das Gift muss ins Blut gelangen. Dabei ist die Menge an giftigen Substanzen in einem Tier meist zu gering, um einen Menschen zu vergiften. In Tieren der Art *Phylllobates terribilis* jedoch sind bis zu 0,5 Milligramm des potentesten Giftes der Pfeilgiftfrösche, dem Steroid-Alkaloid Batrachotoxin (BTX), enthalten. Die halbmaximale tödliche BTX-Dosis ► (LD_{50}) liegt für Mäuse bei diesem Gift bei bereits 0,002 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht. BTX ist ein komplexes Ringmolekül, das das Schließen von Natriumkanälen verhindert und somit eine Dauererregung der Muskulatur erzeugt. Ein anderes Alkaloid, das man aus dem Gift von Pfeilgiftfröschen isolieren konnte, ist das Epibatidin. Man hat es entdeckt, als man das Gift des ecuadorianischen Baumsteigerfrosches *Epipedobates tricolor* auf schmerzstillende Eigenschaften untersucht hat. Nach langjähriger Arbeit hat man das nur in winzigen Mengen

vorkommende Epibatidin als Hauptwirkstoff des Giftgemisches ausgemacht. Seine schmerzstillende Wirkung ist bei Mäusen zweihundertmal stärker als ► Morphin.

Wie Schnecken Fische fangen

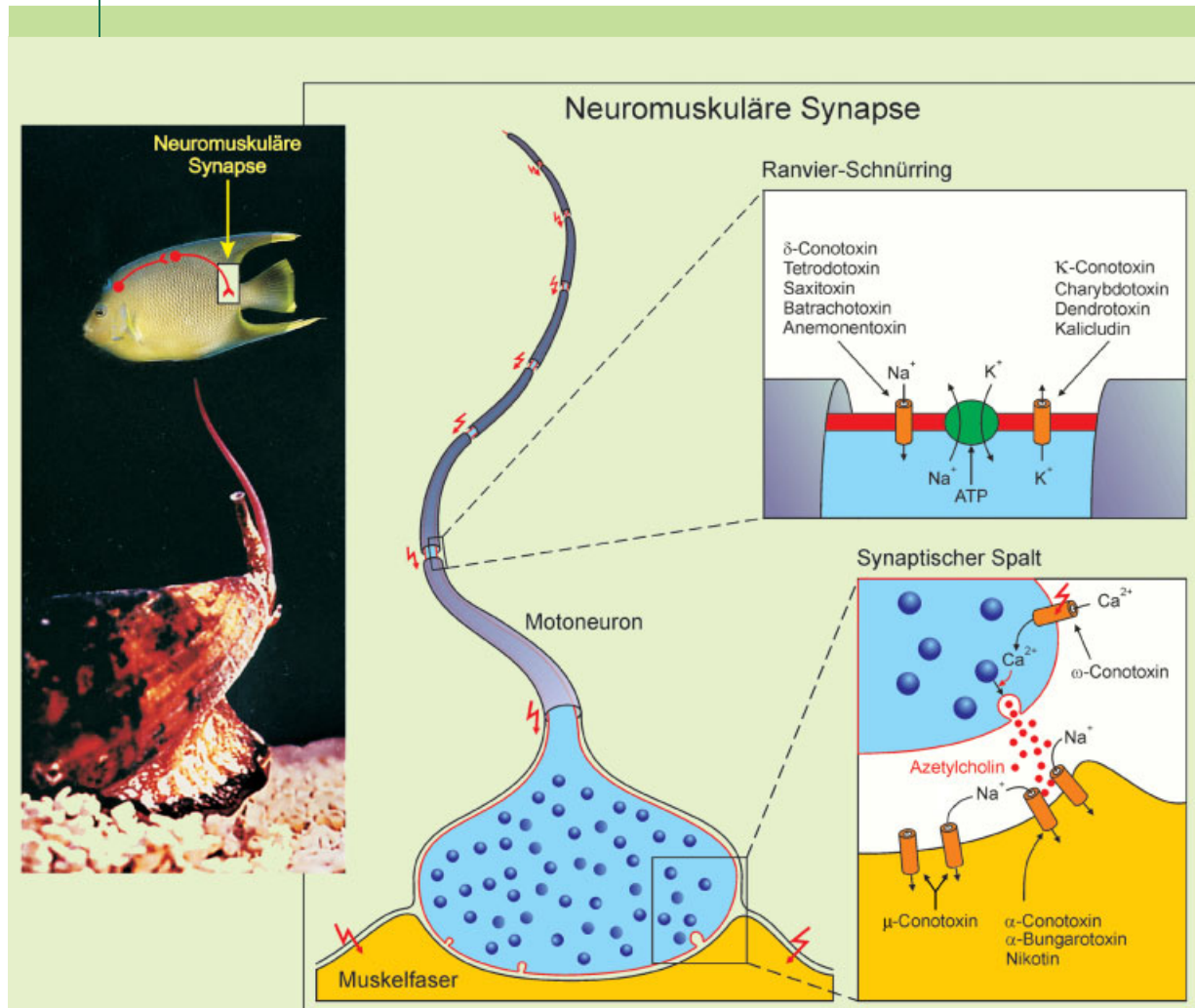
Für viele Tierarten ist die hohe Wirksamkeit ihrer Gifte lebensnotwendig: Je besser das Gift, desto größer ist ihre Chance zu überleben und sich fortzupflanzen. Infolge dieses über Jahrtausende anhaltenden Evolutionsdrucks hin zur Perfektion der Toxine in Jagd- und Verteidigungsgiften sind Substanzen mit nahezu unvorstellbarer Wirksamkeit entstanden. Der Toxinforscher Heinrich Terlau vom Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen fand heraus, dass schon winzige Mengen des Giftes der Kegelschnecke *Conus purpurascens* genügen, um einen Fisch im Verlauf weniger Sekunden zunächst in schockartige Erstarrung und dann in einen hilflosen Lähmungszustand verfallen zu lassen [10]. Um eine solch dramatische Wirkung auszulösen, müssen die Toxine sich schnell vom Ort des Einstichs durch den Organismus ausbreiten und dann schlagartig genau diejenigen Strukturen blockieren, die der Fisch für die Flucht benötigt: die neuromuskulären Synapsen, die Schlüsselstellen der willkürlichen Steuerung der Muskulatur. Abbildung 2 zeigt den Aufbau einer Synapse, wie sie in der Flossenmuskulatur von Fischen, aber ebenso in der Bewegungsmuskulatur aller Wirbeltiere zu finden ist. Der Befehl zum Flossenschlag entsteht im Gehirn, wird über Nervenfasern ins Rückenmark geleitet und dort an Motoneurone übergeben, das sind Nervenzellen, die auf die Kontrolle der Muskulatur spezialisiert sind. Eine Vielzahl von Motoneuronen leitet das Signal zur Flossenmuskulatur, und an dem Ort, an dem das Nervensignal auf die Muskelfasern übertragen wird, der neuromuskulären Synapse, schlagen die Toxine der Kegelschnecke zu.

Das Signal erreicht die Synapse in Form von Aktionspotentialen, kurzen elektrischen Impulsen, die mit Geschwindigkeiten um 100 m/sec vom Rückenmark zur neuromuskulären Synapse laufen. Aktionspotentiale entstehen durch das zeitlich fein abgestimmte Öffnen und Schließen von Natrium- und Kaliumkanälen. Beim Eintreffen der Aktionspotentiale in der Synapse werden Kalziumkanäle geöffnet und leiten Kalziumionen (Ca^{2+}) in die präsynaptische Nervenendigung. Dieses Kalziumsignal setzt einen komplexen Mechanismus in Gang, der zur Freisetzung des Neurotransmitters Azetylcholin aus Speichervesikeln führt. Azetylcholin gelangt in den synaptischen Spalt und überträgt das Signal von der Nervenendigung auf die Muskelfaser. Denn in der gegenüberliegenden Membran, der postsynaptischen Membran der Muskelfaser, werden spezielle Ionenkanäle, die Azetylcholinrezeptoren, geöffnet und leiten Strom in die Muskelfaser. Sofort entstehen auch hier Aktionspotentiale durch das gleiche Wechselspiel von Natrium- und Kaliumkanälen wie in der Nervenmembran, und die Erregung ist in der Muskelfaser angekommen. Der Muskel kontrahiert, die Flosse bewegt sich, und der Fisch bringt sich in Sicherheit.

Aber nicht, wenn er von einer Kegelschnecke gestochen wird. Denn die Conotoxine verhindern die Signalübertragung, indem sie jeden der beteiligten Ionenkanäle mit einem spezifischen, hochwirksamen Toxin blockieren und damit die Flucht vereiteln. δ -Conotoxin und κ -Conotoxin lösen durch die Überaktivierung von Natrium- und die

Hemmung von Kaliumkanälen in den Ranvier-Schnürringen (Abbildung 2) ein Dauerfeuer von Aktionspotentialen in den Motoneuronen aus. Die Wirkung ist die gleiche wie bei einem elektrischen Schock: Der Fisch erstarrt in einem Muskelkrampf, er ist bewegungsunfähig. Dann wird die Signalübertragung an der Synapse ausgeschaltet: ω -Conotoxin

ABB. 2 | DIE VERGIFTUNG DER NEUROMUSKULÄREN SYNAPSE



Manche Kegelschnecken jagen Fische. Sie können ihre Beute innerhalb weniger Sekunden lähmen, indem sie die Kontrolle der Flossenmuskulatur an der neuromuskulären Synapse (links) unterdrücken. Die schematische Darstellung (rechts) der Synapse zeigt ein Motoneuron (blau) mit den azetylinhaltigen Vesikeln sowie die Muskelfaser (gelb). Das elektrische Signal erreicht die Synapse in Form von Aktionspotentialen, die an den Ranvier-Schnürringen durch ein genau festgelegtes Programm der Aktivierung von Ionenkanälen entstehen (rechts oben). Adenosintriophosphat (ATP)-abhängige Ionenpumpen halten Konzentrationsgradienten über der Membran der Nervenfasern aufrecht: Die K^+ Konzentration ist innen etwa dreifach so hoch wie außen, bei Na^+ ist das umgekehrt. Beim Eintreffen eines elektrischen Signals vom vorhergehenden Schnürring öffnen sich für kurze Zeit Na^+ -Kanäle und gleich danach K^+ -Kanäle. Es kommt wegen der gegensinnigen Konzentrationsgradienten der beiden Ionensorten zunächst zu einem Na^+ -Einstrom in die Nervenfasern, dann zu einem K^+ -Ausstrom. Die dadurch verursachte Änderung des Membranpotentials ist das Aktionspotential, die grundlegende Informationseinheit des Nervensystems. In der präsynaptischen Membran öffnen die Aktionspotentiale Kalziumkanäle (rechts unten). Der Einstrom von Ca^{2+} führt zur Freisetzung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt und zur Öffnung der entsprechenden Ionenkanäle in der postsynaptischen Membran der Muskelfaser. Na^+ -Einstrom löst die elektrische Erregung der Muskelmembran aus – der Muskel kontrahiert. Die Angriffspunkte einer Reihe von spezifischen Neurotoxinen sind rechts gezeigt.

Kegelschnecke *Conus purpurascens* aus Terlau et al., 1996 [10], Bermuda Kaiserfisch *Holacanthus bermudensis* aus www.aquarium-berlin.de

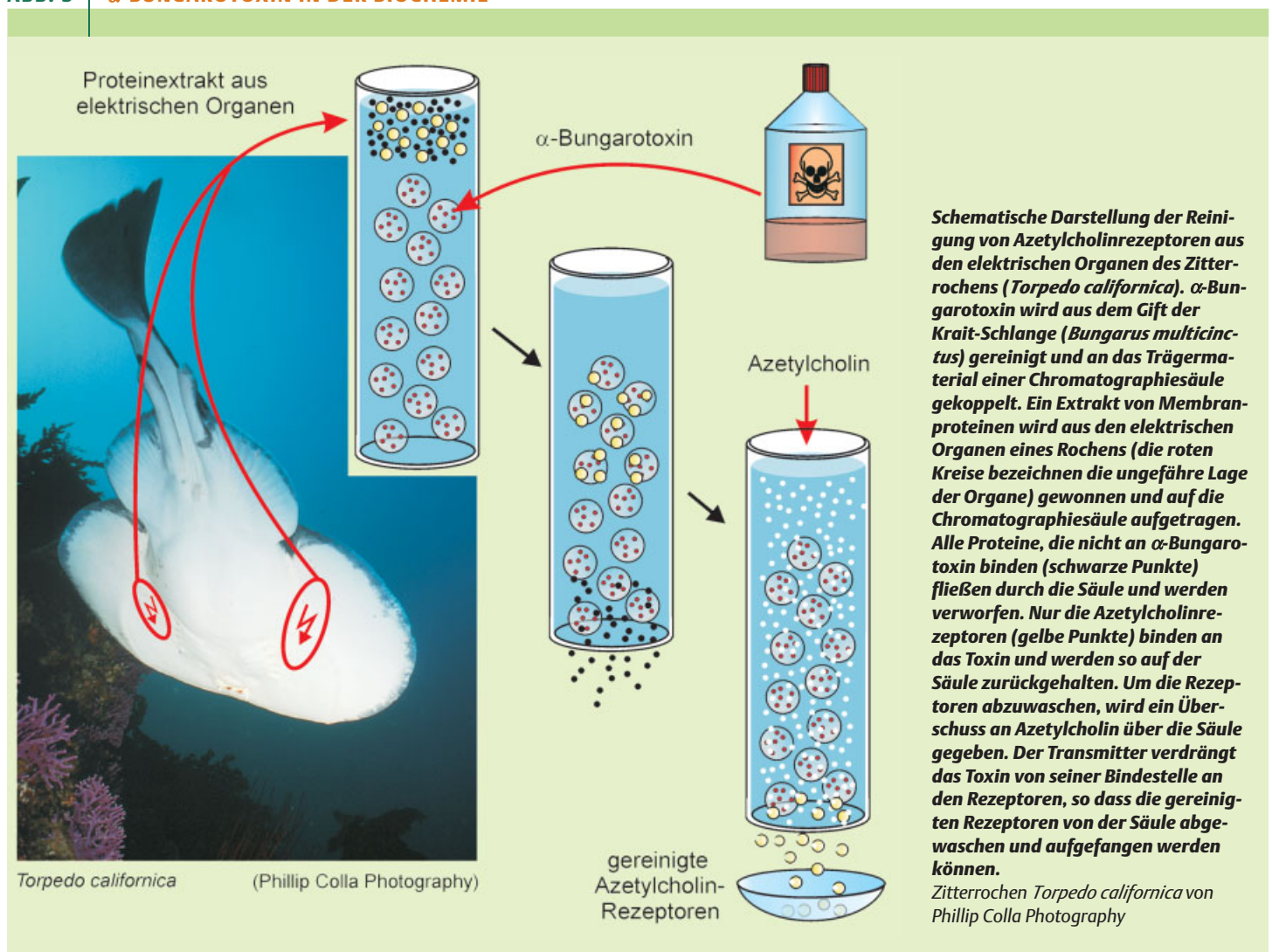
blockiert die präsynaptischen Kalziumkanäle und damit die Ausschüttung von Azetylcholin, α -Conotoxin blockiert Azetylcholinrezeptoren, und μ -Conotoxin blockiert postsynaptische Natriumkanäle, so dass keine Aktionspotentiale in der Muskelmembran entstehen können. Jedes einzelne der fünf Conotoxine würde ausreichen, um die Steuerung der Muskulatur zu blockieren und den Fisch zu lähmen. Aber durch die gleichzeitige Vergiftung von fünf beteiligten Ionenkanälen mit jeweils spezifischen Toxinen erreicht die Schnecke einen sehr schnellen Vergiftungseffekt: Erstarrung und Lähmung treten in wenigen Sekunden ein, so dass sich der gestochene Fisch nicht mehr von der Kegelschnecke entfernen kann – und das ist wichtig für das nur langsam kriechende Raubtier.

Toxine als Werkzeuge in der Forschung

Was für die Schnecke lebensnotwendige Jagdwaffen sind, maßgeschneiderte Toxine für jede Art von Ionenkanal, das

sind für die biologische Forschung hochinteressante Werkzeuge zur Erforschung eben der Kanäle, welche die Schnecke ausschalten will. So blockiert beispielsweise ω -Conotoxin in winzigen Konzentrationen die präsynaptischen Kalziumkanäle, ist aber völlig wirkungslos an allen anderen Kanälen der Synapse. Tatsächlich kann das Toxin sogar zwischen einzelnen Arten von Kalziumkanälen unterscheiden und blockiert ausschließlich die Kalziumkanäle in der präsynaptischen Membran, nicht aber andere Sorten von Kalziumkanälen, beispielsweise solche, die in Herzzellen oder in der Gefäßmuskulatur zu finden sind. Genau diese Kombination von hoher Wirksamkeit und Spezifität macht dieses Toxin überaus wertvoll für die Erforschung der präsynaptischen Kalziumkanäle. Eine Vielzahl von Tiergiften enthält Toxine, die spezifisch gegen bestimmte Ionenkanäle gerichtet sind. Diese Toxine spielen eine zentrale Rolle in der Ionenkanalforschung, insbesondere in der Neurobiologie [8].

ABB. 3 | α -BUNGAROTOXIN IN DER BIOCHEMIE



Die enorme Spezifität von Toxinen kann beispielsweise für die Darstellung von Ionenkanälen in der Ultrastrukturforschung nutzbar gemacht werden. Aus dem Gift der Krait-Schlange (*Bungarus multicinctus*) wurde das α -Bungarotoxin isoliert, das mit hoher Affinität an die Azetylcholinrezeptoren in der postsynaptischen Membran bindet. Dadurch wird die Öffnung der Kanäle und die Erregungsübertragung auf die Muskelfaser verhindert, und das Beutetier der Schlange ist gelähmt. In der Anatomie macht man sich die selektive Bindung des Toxins zunutze, um Azetylcholinrezeptoren im Gewebe sichtbar zu machen. Dazu wird ein fluoreszierender Farbstoff an das α -Bungarotoxin gekoppelt, und das auf diese Weise sichtbar gemachte Toxin wird auf einen Gewebeschnitt gegeben. Nur dort, wo das Toxin bindet, also nur an Strukturen, die Azetylcholinrezeptoren tragen, kann man dann im Mikroskop ein Fluoreszenzsignal erkennen.

In der Biochemie nutzt man die hohe Bindungsaffinität und Spezifität von Toxinen zum Aufreinigen von Proteinen. So begann die detaillierte Erforschung von Azetylcholinrezeptoren mit ihrer Reinigung durch α -Bungarotoxin-Affinitätschromatographie (Abbildung 3). Eine ergiebige Quelle für Azetylcholinrezeptoren sind die elektrischen Organe des Zitterrochen (*Torpedo californica*). Umgewandelte Muskelzellen in diesen Organen tragen eine extrem hohe Dichte von Azetylcholinrezeptoren, die den Strom zur Erzeugung starker Spannungsschläge (bis zu 1000 V) liefern, mit denen das Tier sich sehr wirkungsvoll verteidigen kann. Um die Azetylcholinrezeptoren aus den elektrischen Organen zu gewinnen, koppeln Biochemiker α -Bungarotoxin an das Trägermaterial einer Chromatographiesäule, über die dann ein Proteinextrakt aus elektrischen Organen gegeben wird. Das Toxin fischt die Azetylcholinrezeptoren aus dem Extrakt heraus, und man kann eine reine Präparation der Rezeptoren von der Säule waschen.

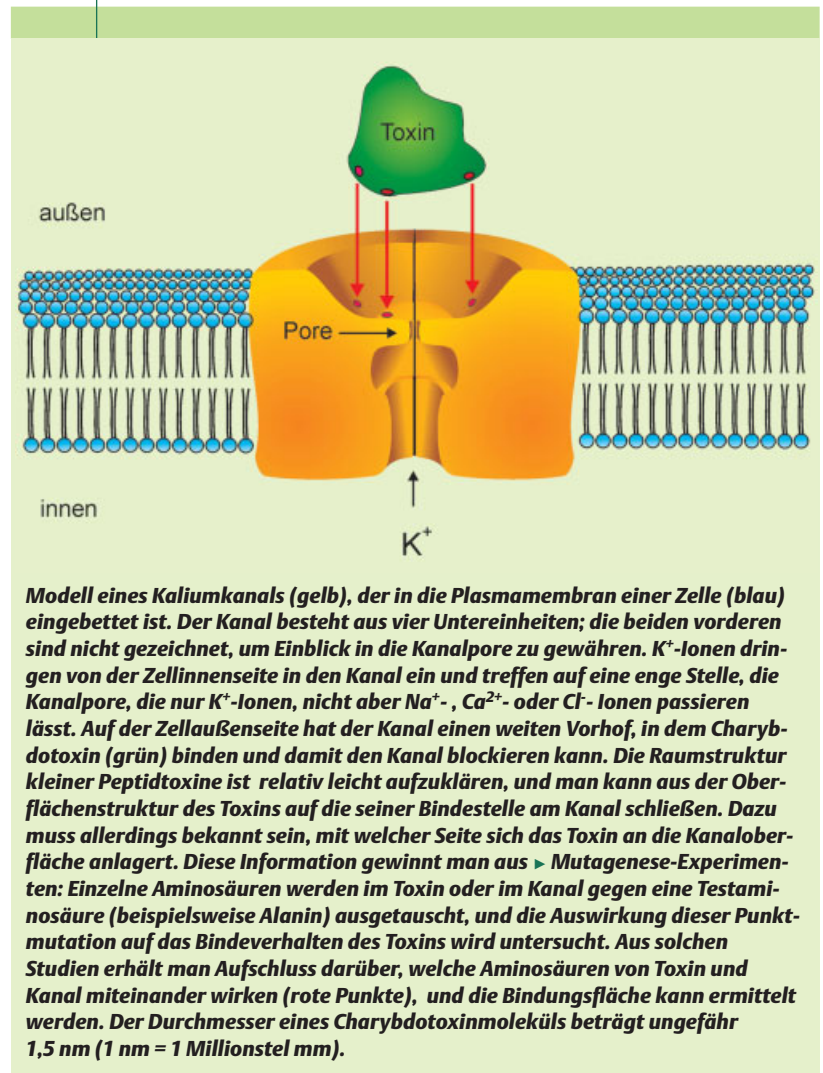
Ein drittes Beispiel für die vielfältige Anwendung von Toxinen in der Forschung ist die Aufklärung der Struktur von Proteinen, insbesondere bei Ionenkanälen, deren Strukturaufklärung besonders schwierig ist. Hier liegt folgende Überlegung zugrunde: Toxine binden an Ionenkanalproteine mit außerordentlich hoher Affinität, die Folge einer starken Wechselwirkung zwischen den Oberflächen von Kanalprotein und Toxin. Man nimmt an, dass der bindende Teil des Toxins eine komplementäre Fläche zur Oberfläche des Ionenkanals bildet, sozusagen einen negativen Abdruck der Kanaloberfläche. Ermittelt man die Oberflächenstruktur eines Toxins, dann kennt man auch die Struktur der Toxinbindestelle an der Oberfläche eines Ionenkanals. Strukturaufklärung an kleinen neurotoxischen Peptiden ist verhältnismäßig einfach und kann Information über die Struktur von Ionenkanälen geben. In Abbildung 4 ist schematisch dargestellt, wie Charybdotoxin eingesetzt wird, um die extrazelluläre Oberfläche von Kaliumkanälen zu "vermessen". Wir verdanken diesen Untersuchungen nicht nur Informationen über die Topographie der äußeren Kanalöffnung, sondern auch die Erkenntnis, dass Kalium-

kanäle Proteinkomplexe bilden, die aus vier Untereinheiten zusammengelagert sind [4]. Toxine mit bekannter Größe und Raumstruktur können also wie molekulare Sonden zur Erforschung der Struktur von Proteinen eingesetzt werden.

Gifte können Schmerzen lindern

Die ausgeprägte Spezifität vieler Toxine, ihre Eigenschaft, mit hoher Affinität an eine bestimmte Art von Protein zu binden, alle anderen Proteine aber unbehelligt zu lassen, diese verblüffende Zielgenauigkeit interessiert Pharmakologen und Mediziner seit langem. Denn für die klinische Anwendung sucht man nach spezifischen Substanzen, Wirkstoffen, die nur den erwünschten therapeutischen Effekt und möglichst keine Nebenwirkungen haben. Wie erfolgreich Toxine aus Tiergiften in der Medizin eingesetzt werden können, zeigt das Beispiel des ω -Conotoxins, dem Peptidtoxin aus dem Jagdgift der Kegelschnecke *Conus*

ABB. 4 | TOXINE HELFEN BEI DER AUFKLÄRUNG DER STRUKTUR VON IONENKANÄLEN



magus. Dieses hochwirksame Toxin wird heute in der Schmerztherapie eingesetzt und hilft Patienten, denen selbst Morphin keine Schmerzlinderung verschafft [5]. ω -Conotoxin kann Schmerzen unterdrücken, weil es an einer Schlüsselstelle der Erzeugung von Schmerzsignalen eingreift – den Synapsen von Schmerzrezeptorzellen (Nozizeptoren) im Rückenmark. Schmerz entsteht, wenn starke, normalerweise gewebsschädigende Reize die sensorischen Fasern der Nozizeptoren erregen. Diese Fasern durchwachen jeden Quadratzentimeter unserer Haut und zudem Gelenke, Knochen und Organe (Abbildung 5). Die Nervenfaser eines Nozizeptors leitet elektrische Impulse (Aktionspotentiale) zum Rückenmark und überträgt dort in einer Synapse das Schmerzsignal auf eine nachgeschaltete Nervenzelle. Diese Synapse ist ganz ähnlich gebaut wie die

oben beschriebene neuromuskuläre Synapse, und ω -Conotoxin greift an der gleichen Stelle ein: an den präsynaptischen Kalziumkanälen, deren Öffnung auch hier die Freisetzung von Neurotransmittern auslöst. Die Kalziumkanäle in der Synapse der Nozizeptoren zeigen eine interessante Besonderheit: Sie stehen unter der Kontrolle von Membranproteinen, die Opiate wie Morphin binden können. Diese Opioidrezeptoren gehören zum körpereigenen System der Schmerzunterdrückung, das bei starkem Stress die Schmerzwahrnehmung vollständig auszuschalten vermag. Erhält ein Patient zur Schmerzlinderung Morphin, bindet die Substanz an die Opioidrezeptoren und verhindert das Öffnen der Kalziumkanäle. Die hemmende Wirkung der Opioidrezeptoren wird durch ein sogenanntes μ -G-Protein auf die Kalziumkanäle übertragen (Abbildung 5). Morphin

ABB. 5 SCHMERZTHERAPIE MIT ω -CONOTOXIN

Schmerzsinneszellen (Nozizeptoren) detektieren Schmerzreize mit ihren sensorischen Nervenendigungen und leiten das Schmerzsignal zum Hinterhorn des Rückenmarks (links). Dort wird das Signal in einer Synapse durch den Neurotransmitter Glutamat an eine nachgeschaltete Nervenzelle übergeben und zum Gehirn weitergeleitet - erst im Gehirn entsteht schließlich die Schmerzempfindung. Die Signalübertragung in der Synapse von Nozizeptoren kann durch Morphin, aber auch durch ω -Conotoxin blockiert werden (Mitte; μ symbolisiert Opioidrezeptoren vom μ -Typ, gelb dargestellt ist das G-Protein, das für die Wirkung von Morphin, nicht aber für die von ω -Conotoxin notwendig ist). ω -Conotoxin ist ein kleines Peptid, dessen Raumstruktur durch drei Schwefelbrücken stabilisiert wird (Mitte unten). Beide Substanzen unterbrechen die Weiterleitung des Schmerzsignals zum Gehirn und sind deshalb wirksame Schmerzmittel. Die direkte Form der Anwendung von ω -Conotoxin ist die kontinuierliche Injektion kleiner Toxinmengen in die Rückenmarksflüssigkeit mit Hilfe einer programmierbaren Pumpe, die dem Patienten implantiert wird (rechts). Mit dieser Methode kann ω -Conotoxin über einen langen Zeitraum hinweg gleichmäßig appliziert und eine andauernde Schmerzlinderung erreicht werden. Abbildung rechts: Medtronic GmbH, Düsseldorf

unterdrückt auf diese Weise die Freisetzung von Transmittern und unterbricht die Signalweiterleitung, so dass das Schmerzsignal nicht zum Gehirn gelangen kann. Selbst bei Aktivierung von Nozizeptoren kommt es deshalb nicht zur Schmerzempfindung.

Schon vor einigen Jahren hat man erkannt, dass ω -Conotoxin an den Synapsen der Nozizeptoren ähnlich wirken müsste wie Morphin – dass das Toxin durch die Blockierung der präsynaptischen Kalziumkanäle die Weiterleitung des Schmerzsignals unterbrechen müsste. In ausführlichen Studien an Tiermodellen hat sich diese Vermutung bestätigt. Um das Toxin lokal an die Rückenmarkssynapsen zu bringen, ohne die neuromuskulären Synapsen zu hemmen, wurde ω -Conotoxin direkt in die Rückenmarksflüssigkeit injiziert. Das Ergebnis war eine deutliche Verminderung der Schmerzempfindlichkeit bei den Versuchstieren. Besonders interessant war bei diesen Studien, dass die schmerzhemmende Wirkung des Toxins auch bei Langzeitanwendung nicht nachließ, während sich bei kontinuierlicher Gabe von Morphin schon nach wenigen Tagen eine Morphintoleranz einstellt; die Wirksamkeit der Morphinanwendung nimmt ab und muss durch steigende Dosen kompensiert werden. Ein biochemischer Mechanismus, den man für die Entstehung von Morphintoleranz verantwortlich macht, ist die Entkopplung der Opioidrezeptoren von ihren G-Proteinen und damit der Verlust der Morphinwirkung auf die Kalziumkanäle. ω -Conotoxin aber wirkt direkt – also ohne Vermittlung von G-Proteinen – auf die Kalziumkanäle, und aus diesem Grund kann sich keine Wirkstofftoleranz ausbilden; das Toxin bleibt auch über längere Anwendungszeit hin in geringen Dosen wirksam. Die Erfolge der Erprobung von ω -Conotoxin an Versuchstieren waren so ermutigend, dass man seit 1996 den Einsatz des Toxins zur Schmerzlinderung bei Menschen erprobt [3].

Schmerztherapie mit ω -Conotoxin ist nur ein Beispiel für die Bedeutung von Tiergiften in der Medizin. Wenn man bedenkt, dass die etwa 500 Arten von Kegelschnecken über 50.000 unterschiedliche Toxine herstellen, von denen nur ein kleiner Bruchteil (circa 0,2 Prozent) bisher erforscht worden ist, erkennt man das große Potential an nützlichen Wirkstoffen, das sich in den Giften allein dieser Tiergattung verbirgt. Klinische Prüfungen mit verschiedenen Conotoxinen werden zur Therapie von Schmerz, Epilepsie, Schlaganfall, Hypertonie, Asthma und Herzrhythmusstörungen durchgeführt, wobei in allen Fällen die hohe Wirksamkeit und Spezifität der Conotoxine für neue Therapieansätze nutzbar gemacht wird. Auch aus dem Gift anderer Tiere hat man therapeutisch wirksame Substanzen isolieren können. So führte ein kleines Peptid aus dem Gift der Viper *Bothrops jaracusa* zur Entwicklung der ACE-Hemmer (beispielsweise Captopril), einer wichtigen Wirkstoffgruppe zur Behandlung von Bluthochdruck. Substanzen aus Schlangengift, welche die Blutgerinnung im Beutetier unterdrücken, führten zur Entwicklung von therapeutischen Wirkstoffen, die zur Vorbeugung gegen Thrombenbildung bei Herzinfarkt- und Schlaganfallpatienten

dienen (beispielsweise Streptokinase). Toxine aus Tiergiften können also bei ganz unterschiedlichen Therapien hilfreich sein, wobei genau der Vergiftungseffekt, der den Tieren zum Jagderfolg verhilft, beim Patienten eine heilsame Wirkung entfaltet.

Zusammenfassung

Die Jagd- und Verteidigungsgifte vieler Tierarten enthalten Toxine, die mit hoher Spezifität gegen Ionenkanäle oder andere Proteine im Beuteorganismus gerichtet sind. Unter den Toxinen findet man Proteine, kleine Peptide, Steroide und viele andere Verbindungen. Ihre Wirksamkeit und Spezifität sind unter starkem evolutionärem Druck in fast unvorstellbarem Maße optimiert worden. Damit verhelfen sie der biomedizinischen Forschung zu aussagekräftigen Experimenten, und eine große Zahl von Toxinen wird heute als Werkzeug in der biologischen Grundlagenforschung eingesetzt. Proteinreinigung, Untersuchung von Expressionsmustern und Strukturaufklärung sind nur einige Beispiele für ihren vielfältigen Nutzen in der Forschung. Wegen ihrer hohen Spezifität bieten sie das Potential für gezielte Anwendung als therapeutische Wirkstoffe mit wenigen Nebenwirkungen. Ein Beispiel für die therapeutische Anwendung ist das ω -Conotoxin aus dem Gift einer marinen Kegelschnecke, das erfolgreich zur Schmerztherapie eingesetzt wird.

GLOSSAR

ACE-Hemmer: blutdrucksenkende Wirkstoffe, deren therapeutischer Effekt auf der Hemmung des angiotensin-converting-enzyme beruht.

Alkaloide: vor allem in Pflanzen vorkommende, meist heterocyclische organische Verbindungen mit einem oder mehreren Stickstoffatomen. Viele pflanzliche Wirkstoffe sind Alkaloide, beispielsweise Nikotin, Koffein und Morphin.

Azetylcholin: Substanz, die als Neurotransmitter die Signalübertragung an Synapsen vermittelt.

Chromatographie: Trennverfahren, mit dem Substanzgemische aufgrund chemischer oder physikalischer Eigenschaften in einzelne Komponenten aufgetrennt werden.

Ionenkanäle: Proteine in der Zellmembran, die Ionen (z. B. Na⁺, K⁺ oder Ca²⁺) über die ansonsten undurchlässige Membran leiten. Der Strom durch Ionenkanäle ist die Grundlage aller bioelektrischen Phänomene wie der Signalleitung in Nervenzellen und der Muskelkontraktion.

G-Protein: Guanosintriphosphat-(GTP)-bindende Proteine, die als Vermittler in zellulären Signaltransduktionsketten wirken. G-Proteine leiten zum Beispiel hormonelle Signale von Hormonrezeptoren in der Zellmembran zu Effektorproteinen im Zellinneren.

LD₅₀-Wert: halbmaximale tödliche (letale) Dosis eines Stoffes bezogen auf einen bestimmten Organismus. Die Dosis, bei der die Hälfte der Versuchstiere getötet wird.

Morphin: Alkaloid aus dem Schlafmohn *Papaver somniferum*, das als wichtigster Wirkstoff des Opiums stark schmerzstillende Wirkung zeigt.

Mutagenese: die Erzeugung von Veränderungen (Mutationen) an Proteinen durch Änderung der kodierenden DNA-Sequenz. Der gezielte Austausch einzelner Aminosäuren (Punktmutation) ist eine wichtige Methode für die Erforschung von Struktur-Funktions-Beziehungen bei Proteinen.

Literatur

- [1] G. G. Habermehl, Gift-Tiere und ihre Waffen. Springer-Verlag, Berlin, 1994.
- [2] R. Hofrichter (Hrsg.), Amphibien, Naturbuch Verlag, Augsburg, 1998.
- [3] K. K. Jain, An evaluation of intrathecal ziconotide for the treatment of chronic pain, *Expert Opinions on Investigational Drugs* **2000**, 9, 2403-2410.
- [4] R. MacKinnon, Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **1991**, 350, 232-235.
- [5] J. M. McIntosh, R. M. Jones, Cone venom – from accidental stings to deliberate injection, *Toxicon* **2001**, 39, 1447-1451.
- [6] D. Mebs, Gifttiere. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2000.
- [7] B. M. Olivera, Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology, *Molecular Biology of the Cell* **1997**, 8, 2101-2109.
- [8] H. Rochat, M.-F. Martin-Eauclaire, Animal Toxins: Facts and Protocols, Birkhäuser Verlag, Basel, 2000.
- [9] E. Teuscher, U. Lindequist, Biogene Gifte, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994.
- [10] H. Terlau, K.-J. Shon, M. Grilley, M. Stocker, W. Stühmer, B. M. Olivera, Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail, *Nature* **1996**, 381, 148-151.

Danksagung

Wir danken Ulrike Lindequist, Gerhard Habermehl, Baldomero Olivera, Phillip Colla und Andreas Wolf für Abbildungen. Die Arbeiten der Autoren an Screeningverfahren für Toxine werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (FOR 450).

Die Autoren



Ilva Putzier, geboren 1976. Von 1995-2000 Studium der Biologie an der Universität zu Köln. Für ihre Diplomarbeit untersuchte sie am Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Forschungszentrum Jülich, Ionenkanäle in Schmerzsinneszellen. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit gilt ihr Forschungsinteresse der Suche nach Toxinen, die gegen Ionenkanäle in Schmerzsinneszellen gerichtet sind und möglicherweise zur Entwicklung neuer Substanzen für die Schmerztherapie führen können.



Stephan Frings, geboren 1956. Von 1980 – 1985 Studium der Biologie in Konstanz. 1989 Promotion an der University of Otago, Dunedin, Neuseeland. 1997 Habilitation im Fach Zoologie an der Universität zu Köln. Sein Forschungsinteresse gilt den molekularen Mechanismen der Signalverarbeitung in Sinneszellen, insbesondere der Rolle von Ionenkanälen bei der Funktion von Riech- und Schmerzsinneszellen. Ein Schwerpunkt seiner Arbeit ist die Entwicklung automatisierter Verfahren zur Suche von Ionenkanal-Toxinen in Tiergiften.

Anschrift:

*Ilva Putzier, Dr. Stephan Frings
Institut für Biologische Informationsverarbeitung
Forschungszentrum Jülich
52428 Jülich
E-mail: i.putzier@fz-juelich.de
s.frings@fz-juelich.de*