

„Von Spinnen und Kegelschnecken: Toxine für den Einsatz in der Diagnostik und Therapie“

Marcel Meub

Herr C. schreckt plötzlich auf. Noch völlig schlaftrunken und orientierungslos versucht er sich im ersten Licht der Morgensonne zu erklären, was ihn aus dem Schlaf gerissen hat. Erst dann bemerkt er den brennenden Schmerz, der sich von seinem rechten Fuß aus langsam sein Bein hinaufzieht. Niemals hatte Herr C. solche Schmerzen gespürt...



Abbildung 1: Die Vogelspinne *Psalmopoeus cambridgei* beim Erlegen einer Eidechse. Das Bild wurde freundlicherweise von Sebastian Wadycki aufgenommen und vom Senckenbergmuseum Frankfurt zur Verfügung gestellt.

So könnten die Symptome eines unvorsichtigen Spinnenhalters bei einem Biss aussehen. Im fiktiven Beispiel hatte der Spinnenhalter sogar ganz besonderes Pech. Der Großteil an bislang untersuchten Spinnen- und Skorpiongiften wirkt bei Säugern lähmend auf das Nervensystem und führt somit – unter Beachtung der Bissposition – nur bei großen Giftmengen zum Tode. Im besagten Fall aber brach ausgerechnet eine mit der Gattung der Vogelspinne verwandte Baumspinne, die Grüne-Trinidad-Vogelspinne (*Psalmopoeus cambridgei*), aus (Abb. 1). Das Gift (Toxin) dieser auf Trinidad beheimateten Spinne enthält spezielle Signalmoleküle. Diese docken an Rezeptoren auf der Oberfläche von Nervenzellen an, die für die Hitze- und Schmerzweiterleitung zuständig sind und

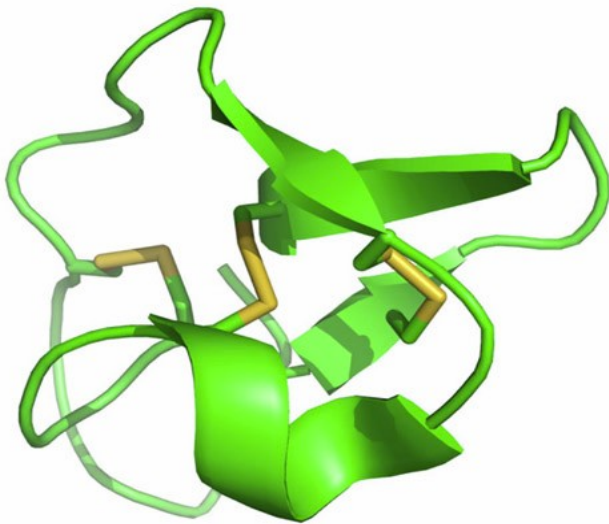
bewirken damit sehr großes Schmerzempfinden.

Vor einigen Jahren wurde von einer amerikanischen Forschergruppe entdeckt, dass es sich bei diesen Signalmolekülen um kleine Proteine handelt, die die gleichen Rezeptoren binden wie Capsaicin, der Stoff, welcher der Chilipflanze ihre Schärfe verleiht. Allerdings binden diese Miniproteine nicht an dieselbe Stelle des Rezeptors, was auch einen biologischen Zweck erfüllt; während der Chilischärfestoff die erwähnten Auswirkungen nur bei Säugern zeigt, kann das Spinnentoxin auch bei Vögeln Schmerzen verursachen. Der Samen der Chilipflanze wird von Vögeln verbreitet, welche Chilis fressen. Die Fortpflanzung der Chili wird somit über die Vögel gesichert. Gegen Säuger will sich die Chilipflanze mit ihrer Schärfe hingegen verteidigen. Die Toxine der Vogelspinne *Psalmopoeus cambridgei* dienen zum Schutz vor Säugern und Vögeln, da sie sich von beiden Wirbeltierklassen nicht fressen lassen wollen [1],[2]. Wer folglich ansatzweise eine Vorstellung davon entwickeln möchte, wie sich Herr C. wohl gefühlt haben muss, kann sich z.B. bei der nächsten kleineren Schnittverletzung einfach eine frische Chili in die Wunde reiben.

Natürliche Toxine sind Fluch und Segen: Es gibt sie in unzähligen Variationen, man findet sie in den unterschiedlichsten Regionen unserer Erde. Sie werden auf verschiedenen Wegen produziert, gehören verschiedenen Substanzklassen an und wirken auf sehr unterschiedliche Weise. Frösche, beispielsweise, produzieren ihre Gifte nicht selbst. Vielmehr beziehen sie ihre Toxine von Käfern, die sie fressen, und setzen sie gegen

Bakterien und Pilze ein, die in ihrer Umgebung vorkommen. Ohne die Gifte würden jene Parasiten auf der feuchten Froschhaut ideal gedeihen können. Je nach Art können Froschgifte beim Menschen schon innerhalb von 20 Minuten zum Tod führen. Andererseits steht das sogenannte Pfeilgift verstärkt im Mittelpunkt der pharmazeutischen Forschung für Anästhetika. Auch einige Toxine von Skorpionen wirken auf das menschliche Nervensystem und führen in seltenen Fällen zum Tod; andere wiederum können als Insektizide verwendet werden [3]. Die Toxine der erwähnten Trinidad Vogelspinne könnten künftig möglicherweise bei der Malariabekämpfung zum Einsatz kommen [4].

Toxine bestehen nicht nur aus einer Komponente. Ein komplexes Gemisch aus verschiedenen Verbindungen – z.T. sogar Mischungen aus proteinogenen und nichtproteinogenen Stoffen – bildet ein natürliches Gift.[3] Die bereits erwähnten kurzen Proteine (im Folgenden Knottins oder Cystinknotenminiproteine) sind Bestandteil einiger Gifte und bilden eine interessante Forschungsgrundlage für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Die folgenden Abschnitte sollen die wissenschaftliche Relevanz dieser Knottins erörtern.



Knottins sind kleine Proteine. Sie bestehen aus lediglich zwei bis drei Dutzend Aminosäurebausteinen. Allen Knottins, die bei Pflanzen, Tieren und sogar bei Menschen vorkommen, gemeinsam ist der hohe Gehalt an der Aminosäure Cystein. Mindestens sechs Cysteine sind vorhanden. Diese sind über ihre Seiten durch Ausbildung von Disulfidbrücken miteinander kovalent verknüpft und fixieren damit die Peptidkette in einer verknoteten und starren Topologie. Diese ist verantwortlich für die außergewöhnlich hohe Temperaturstabilität sowie ihre Resistenz gegen enzymatischen Abbau durch Proteasen, die in unserem Darm, aber auch in Blut und Geweben in großer Zahl vorkommen. Die proteolytische Stabilität in Verbindung mit der hohen intestinalen Aufnahmegeschwindigkeit lassen auf die Möglichkeit einer oralen Aufnahme hoffen. Aufgrund ihrer geringen Größe sind Knottins auch synthetisch zugänglich. Nicht-natürliche Cystinknotenminiproteine werden z.B. schon

Abbildung 2: 3D-Darstellung eines Cystinknotenminiproteins (Aminosäuresequenz: SGSDGGVC¹PKILKKC²RRDSDC³PGAC¹IC²RGNGYC³G). Die für die Stabilisierung des Strukturgerüsts maßgeblichen Seitenketten der Cysteine sind in gelb eingezeichnet. Die miteinander verknüpften Cysteine sind durch die gleiche hochgestellte Zahl markiert.[6]

beim Tumor-Imaging und als Schmerzmittel eingesetzt [5].

Knottins haben die Größe von Peptiden, besitzen allerdings eine Struktur, die an Proteine erinnert. Ihr schlaufenartiges Gerüst (Abbildung 2) ist verantwortlich für die Namensgebung sowie für die erwähnte Stabilität. So trotzen Knottins beispielsweise wochenlang Temperaturen um die 65 °C ohne Strukturveränderung, sind beständig gegen 1 N NaOH bzw. 1 N HCl und oft resistent gegen Serum- und Intestinalproteasen [5].

Eine andere Klasse von geknoteten Miniproteinen mit Disulfidbindungen sind Cyclotide. Im Unterschied zu den meisten natürlich vorkommenden Proteinen ist die Aminosäurekette bei diesen zu einem Ring geschlossen. Cyclotide weisen ein breites Spektrum an biologischer Aktivität auf. Das erste entdeckte Cyclotid – Kalata B1 – ist ein orales Wehenmittel, welches von einem afrikanischen Stamm als Tee zubereitet wird, um die Geburt zu beschleunigen [5].

Cystinknotenminiproteine können aus natürlichen Quellen wie *mollusca* (Weichtiere), *vertebrata* (Wirbeltiere), *arthropoda* (Gliederfüßer) u.v.m. isoliert werden. Von Kegelschnecken wurden beispielsweise zahlreiche Knottins isoliert, welche auf Spannungsgesteuerte Ionenkanäle wirken. In der Praxis wird das Omega-conotoxin MVIIa der Kegelschnecke *Conus magus*, welches als Kalziumkanalblocker fungiert, bereits in Kliniken als sehr gut wirksames Schmerzmittel und häufig als Morphiumersatz verwendet. Als weitere medizinische Anwendung wird derzeit diskutiert, das Toxin als Medikament bei Schädel-Hirn-Traumata nach ischämischen Schlaganfällen einzusetzen.

Zur natürlichen Vielfalt der Miniproteine kommt hinzu, dass man zusätzlich Einfluss auf ihre Bioaktivität nehmen kann. Dadurch gewinnen sie eine besondere Bedeutung für die Medizin. So ist es möglich, einzelne Aminosäuren aus den Schlaufen zu entfernen,

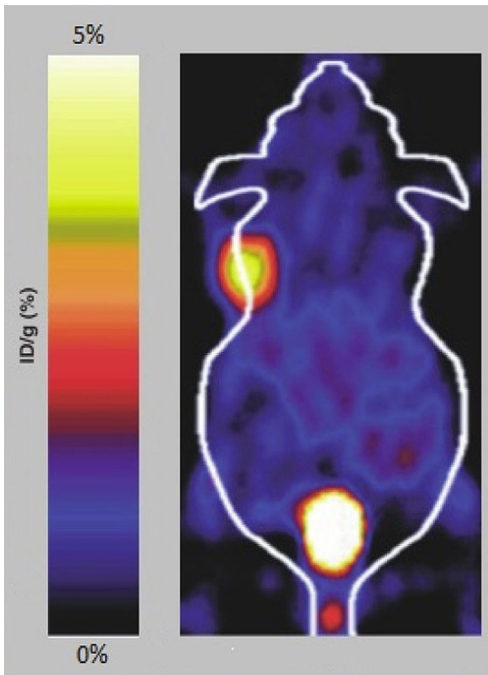


Abbildung 3: MicroPET-Bild einer Maus mit einem xenotransplantierten menschlichen U87MG-Tumor. Der Maus wurde ein Miniprotein injiziert, welches an $\alpha_v\beta_3$ -, $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Integrine bindet. Das Bild zeigt die Ansammlung von Radioaktivität (ID/g: Injected dose per gram of tissue) 1h nach der Injektion des Miniproteins. Der helle Fleck in der linken Flanke des Tieres zeigt den implantierten Tumor an. Der zweite Spot zeigt die Ansammlung von radioaktivem Miniprotein in der Harnblase an, da dieses über die Nieren rasch ausgeschieden wird. Das Bild wurde dankenswerterweise von Prof. Jennifer R. Cochran (Stanford University) zur Verfügung gestellt.

hinzuzufügen oder zu ersetzen und damit die Wirkung der Miniproteine gezielt zu beeinflussen. Vita *et. al.* z.B. stellten ein neues curaremimetisches Knottin her, indem sie eine funktionale Zentrumsschleife eines Schlangentoxins auf ein strukturell ähnliches Cystinknotenminiprotein eines Skorpions aufpfropften, wobei das Hybridmolekül Acetylcholinrezeptoren auf Nervenzellen blockierte [5]. Ähnliche Beispiele gibt es für zahlreiche pflanzliche, tierische und menschliche Knottins, welche zeigen, dass durch minimale Veränderungen Aktivitäten merklich gesteigert – Erhöhungen um das 1000-fache sind kein Einzelfall –, sowie neue Aktivitäten hinzugefügt werden können.

Ein weiteres vielversprechendes aber noch junges Forschungsgebiet betrifft den Einsatz von Cystinknotenminiproteinen beim Tumor-Imaging. Wie kann man Tumore schon im sehr frühen Stadium im Körper aufspüren? Dieser Frage wird heute in verschiedene Richtungen nachgegangen. Eine sehr empfindliche Nachweismethode beruht auf der Radioaktiv-Markierung von Molekülen, die selektiv an Tumorzellen andocken können und sich daher dort anhäufen. Die Akkumulation radioaktiver Verbindung kann dann mithilfe eines Tomographen (PET/SPECT) erfasst und lokalisiert werden. Als gute Marker für Tumorzellen haben sich in den letzten Jahren sogenannte $\alpha_v\beta_3$ Integrine erwiesen. Diese Proteine kommen auf der Oberfläche von Tumorzellen gehäuft vor. Gesucht sind somit Moleküle, die spezifisch und mit hoher Affinität an $\alpha_v\beta_3$ Rezeptoren andocken und diese später im PET-Bild sichtbar machen. Die Arbeitsgruppe von Jennifer Cochran von der Stanford Universität hat hier Pionierarbeit geleistet. Ihr gelang es, aus mehr als zehn

Millionen verschiedenen von Hefezellen erzeugten Knottins ein Miniprotein zu isolieren, das selektiv und mit hoher Affinität an das $\alpha_v\beta_3$ Integrin bindet. Der Einsatz radioaktiv-markierter Knottins beim Tumor-Imaging befindet sich noch in der Testphase, wurde aber an Mäusen bereits erfolgreich durchgeführt (siehe Abbildung 3) [5, 7].

Zusammenfassung:

Knottins sind Miniproteine, die in der Natur weit verbreitet sind und sowohl eine große Funktionsvielfalt zeigen als auch eine außergewöhnliche biologische und thermodynamische Stabilität aufweisen. Diese Stabilität wird durch Seitenkettenverknüpfung von drei Cysteinpaaren erreicht. Das Knottin-Strukturgerüst ist stabil aber plastisch. So sind zur Einbringung neuer Funktionen Variationen der Schleifenregion unter Erhalt des Grundgerüsts möglich. Damit kann das ohnehin schon breite Spektrum natürlicher Aktivitäten durch die Einführung neuer Bindungscharakteristika erweitert werden, um maßgeschneiderte Miniproteine zu erhalten, die therapeutischen oder diagnostischen Ansprüchen gerecht werden.

Dieser Artikel zeigt, was Spinnen und Chilis gemeinsam haben, und illustriert einmal mehr die Bedeutung der Isolierung und Analyse von Naturstoffen und Naturstoffanaloga für Anwendungen in den Biowissenschaften und der Medizin.

Kontakt:	Schlauer Fuchs
 <p>Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (Woche 2). Der Autor Marcel Meub ist Studierender im Masterstudiengang Chemie</p> <p>(E-Mail: marcel.meub@gmx.de).</p> <p>Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Harald Kolmar (E-Mail: kolmar@biochemie-tud.de)</p>	<p>Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:</p> <p>Warum sind Knottins außergewöhnlich temperaturstabil und resistent gegen enzymatischen Abbau durch Proteasen?</p>
Literatur:	
<p>[1] Siemens, J., et al., <i>Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain</i>. Nature (London, U. K.), 2006. 444: p. 208-212.</p> <p>[2] <i>Was Spinnen und Chilis gemeinsam haben</i>. GENOMXPRESS, 2006. 4: p. 42.</p> <p>[3] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/biotoxine/tiergifte.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/biotoxine/zoo.vscml.html</p> <p>[4] Choi, S.-J., et al., <i>Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula Psalmopoeus cambridgei</i>. FEBS Lett., 2004. 572: p. 109-117.</p> <p>[5] Kolmar, H., <i>Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered cystine knot miniproteins</i>. Curr. Opin. Pharmacol., 2009. 9: p. 608-614.</p> <p>[6] Heitz, A., et al., <i>Solution Structure of the Squash Trypsin Inhibitor MCoTI-II. A New Family for Cyclic Knottins</i>. Biochemistry, 2001. 40: p. 7973-7983.</p> <p>[7] Silverman, A.P., et al., <i>Engineered cystine-knot peptides that bind alpha(v)beta(3) integrin with antibody-like affinities</i>. J Mol Biol, 2009. 385: p. 1064-75.</p>	