



FACT SHEET

Conotoxine

1. Allgemeines

Conotoxine sind toxische Peptide mit einer Länge von 10 bis 40 Aminosäuren¹ (AA), die von Kegelschnecken synthetisiert werden². Sie verfügen über ausgeprägte und sehr rigide Sekundärstrukturen, welche für Peptide dieser Grösse ungewöhnlich sind⁶. Diese werden ermöglicht durch eine starre Strukturierung der Peptide durch 1 bis 5 Disulfidbrücken⁸. Obwohl Disulfidbrücken meistens intramolekular gebildet werden, sind auch Peptide bekannt, die sich zu Dimeren verbinden⁹.

2. Kegelschnecken

Conotoxine sind neurotoxische Peptide die von Kegelschnecken (Genus *Conos*) zur Nahrungsbeschaffung und Verteidigung synthetisiert werden¹⁰. Die Tiere können in allen warmen Ozeanen gefunden werden, sind jedoch hauptsächlich im westindischen Pazifik beheimatet. Über einem Zeitraum von 55 Millionen Jahren haben sich über 700 Spezies entwickelt¹⁰.

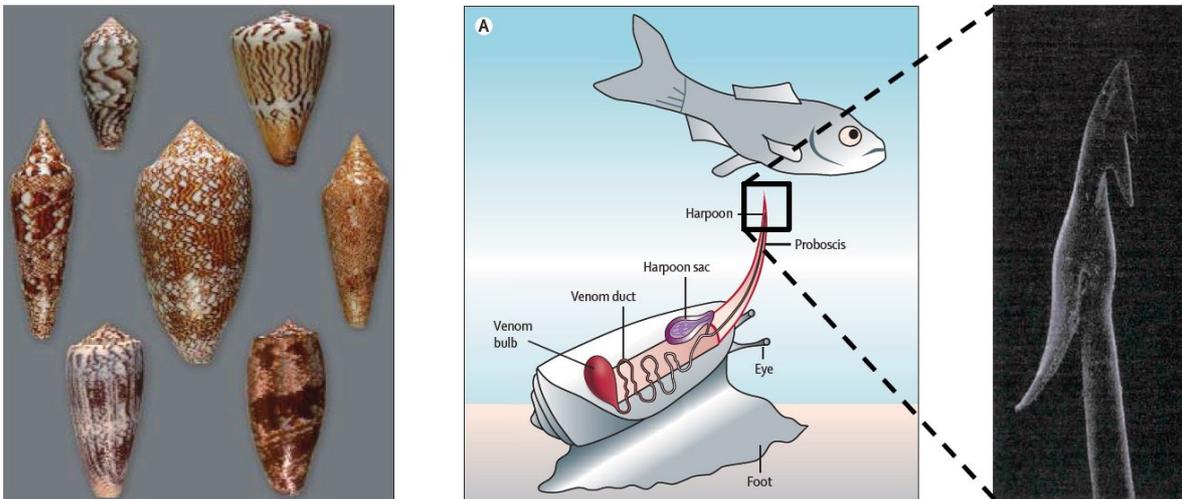


Abb. 1: Anatomie des Kegelschnecken:

Die Gehäuse der Kegelschnecken sind oft aufwändig geschmückt (Links). In der schematischen Darstellung sind die Organe des Giftapparates einer Fisch-jagenden Kegelschnecke beschriftet und farbig hervorgehoben (Mitte). Das Gift wird durch Kontraktion des Giftsacks durch die Giftgefässe gedrückt und erreicht das Gewebe des Beutetiers mittels einer hohlen Harpune. Die Harpune ist mit Wiederhaken versehen und wird von der Schnecke kontinuierlich nachgebildet. Der Aufbau der Harpune der Kegelschneckenspezies *Conus Obscurus* wurde mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskopes analysiert (Rechts). Die Grafiken wurden übernommen von Chivian et al. 2003³ (Links), Schmidtko et al. 2010⁵ (Mitte) und Olivera et al. 1991⁷ (Rechts).

Der evolutionäre Wettlauf zwischen den Schnecken und ihrer Beute hat über Millionen von Jahren die Toxine auf Selektivität und Potenz selektiert¹¹. Die Zusammensetzung des Toxincocktails unterscheidet sich stark zwischen individuellen Arten und es können über hundert einzigartige Toxine pro Spezies identifiziert werden¹⁰.

Kegelschnecken können in drei Gruppen eingeteilt werden, nach Beutetieren auf die sie sich spezialisiert haben: Fische (piscivore), Würmer (vermivore) und Weichtiere (molluscivore). Die Zusammensetzung des Giftcocktails unterscheidet sich zwischen den drei Ernährungsweisen. Auf Fische spezialisierte Schnecken verfügen über die für den Menschen gefährlichsten Toxine¹². Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass als Schnecke die Jagd nach Fischen enorm schnell wirkende Toxine erfordert. Zudem stehen Fische verwandtschaftlich dem Menschen am nächsten¹². Eine Vertreterin dieser Gruppe, die Spezies *Conus geographus*, vermag mit ihrer Harpune Neoprenanzüge zu durchdringen¹³ und mit einem einzigen Stich einen Menschen zu töten¹⁴.

3. Toxizität

Die meisten Conotoxine sind auf Grund Ihrer Wirkungsweise und niedrigerer Toxizität für den Menschen nicht bedenklich¹². Die potentielle Gefahr die von Toxinen ausgeht, lässt sich von deren pharmakologischen Wirkungsweise ableiten. Diese welche mit Hilfe von griechischen Buchstaben angegeben wird.

- α -Conotoxine blockieren die Nikotinrezeptoren und verursachen Muskellähmungen¹².
- δ -Conotoxine verlängern das Aktionspotential durch das Hemmen der Natriumkanäle in Säugetieren, was ebenfalls die Muskelaktivität stört¹².
- κ -Conotoxine blockieren Kaliumkanäle. Dadurch wird die Wiederherstellung des Aktionspotentials verlangsamt und der Muskel im vollständig kontrahierten Zustand blockiert¹². Speziell im Zusammenhang mit Herzversagen ist dieses Toxin von Bedeutung¹².

α (alpha)-, δ (delta)- und κ (kappa)-Conotoxine bergen für den Menschen die grösste Gefahr, da sie zu Muskelfehlfunktionen führen, die für den Menschen tödlich enden können¹². δ - und κ -Conotoxine wirken synergistisch, was in Kombination zu einer anhaltenden maximalen Muskelkontraktion führt¹⁵. Das Zusammenspiel der beiden Toxinklassen übersteigt dabei die Potenz der individuellen Toxine und kann mit einem Elektroschock verglichen werden (‚Elektroschock Cabal‘)¹². Kegelschnecken organisieren ihre Toxine gezielt in synergistischen Gruppen, den sogenannten ‚Cabals‘ um so deren Wirkung zu verstärken¹⁶.

Symptome nach einem Kegelschneckenstich sind abhängig von der Zusammensetzung des Giftcocktails. Oft werden Schwächegefühle, Aussetzen von Reflexen, eingetrübter Blick, Sprachstörungen und Taubheit beschrieben¹². Muskellähmungen und das damit einhergehende Atemversagen sind die Hauptursachen für die tödliche Wirkung von Conotoxinen¹². Das Toxingemisch unterscheidet sich stark von Spezies zu Spezies und ist eine komplexe Kombination mehrerer Peptide¹³. α -Conotoxine werden als die pharmakologisch gefährlichste Giftklasse der Kegelschnecken eingestuft. Diese blockieren die Muskelkontraktion und führen somit zu Lähmungserscheinungen bis zum Tod durch Atemstillstand¹².

Gegen Conotoxine ist bis heute kein Gegenmittel bekannt¹². Im Vergiftungsfall müssen die Vitalfunktionen insbesondere die Atmung sofort unterstützt werden. Falls bei einem Kegelschneckenstich die letale Dosis erreicht wird, tritt der Tod Berichten zufolge binnen 1 und 5 h Stunden ein¹⁷. Auf Grund der vielseitigen Peptidzusammensetzung ist es unmöglich die Giftigkeit von Conotoxinen generell zu beschreiben. Eine unbestätigte Studie in Mäusen hat die Toxizität für gewisse α -Conotoxine nach Injektion bei $LD_{50} \cong 5 \mu\text{g} / \text{kg}$ angesetzt¹⁸

4. Conotoxine als Schmerzmittel

Die Wahrnehmung von Schmerzen kann generell in zwei Kategorien eingeteilt werden: akute und chronische Leiden. Während die Fähigkeit der akuten Schmerzempfindung lebenswichtig ist, ist die Funktion von andauernden Schmerzen bis heute ungeklärt. Oftmals sind diese auf Verletzungen des schmerzleitenden Nervensystems selbst zurückzuführen und reduzieren die Lebensqualität der betroffenen Menschen dramatisch. Zurzeit werden chronische Schmerzen überwiegend mit Opiaten behandelt¹⁹. Opiate sind seit über 2'000 Jahre bekannt und mit starken Nebenwirkungen behaftet, verlieren ihre Wirkung über Zeit und können zur Abhängigkeit führen²⁰. Der Einsatz von Conotoxinen als Schmerzmittel im Jahr 2005 (Ziconotide) ist ein Meilenstein in der Identifikation von neuen pharmakologischen Substanzen^{19,21}. Dank ihrer hohen Selektivität sind Conotoxine nicht nur auf Schmerzlinderung beschränkt sondern haben ein unglaubliches Potential für eine Vielzahl von Anwendungen²⁰. Der gesamte Toxinpool des Genus *Conus* wird auf 70'000 – 100'000 Substanzen geschätzt, die an eine unvergleichliche Anzahl neurologischer Ziele binden^{10,22}. Diese Diversität übertrifft alle anderen Gifttiere dieser Welt²². Bis heute wurde nur ein Bruchteil (ca. 0.1 %) dieser Toxine pharmakologisch analysiert²³. Die Toxine versprechen Anwendungen im Bereich von chronischen Schmerzen, Epilepsie und anderen Schädigungen des Nervensystems^{13,19}.

4.1. Beispiel Ziconotide (Prialt®)

Ziconotide (Prialt™) ist ein ω -Conotoxin²⁴ das von der Fisch-jagenden Kegelschnecke *Conus magus* produziert wird²⁴. Das 25 AA lange Peptid weist eine VI/VII Cysteinstruktur auf (Abb. 3), die durch 3 Disulfidbrücken stabilisiert wird. Der Wirkungsmechanismus von Ziconotide wurde wegen seiner Verwendung in der Medizin sehr genau studiert und dient hier als Beispiel für den Einfluss von Conotoxinen auf das Nervensystem. 2005 wurde in Europa das Conotoxin Ziconotide (Prialt®) als erstes Schmerzmittel, das aus einem Meeresorganismus isoliert wurde, zugelassen²¹. Es ist ein starkes Schmerzmittel, das seine Wirkung auch über lange Zeit beibehält, da sich keine Toleranz einstellt²⁰. Es wirkt sogar dann noch, wenn durch die Gewöhnung der Patienten Opiate bereits ihre Wirkung verloren haben²⁰. Mehrere hundert synthetische Varianten des natürlichen Toxins wurden getestet, jedoch blieb die natürliche Sequenz die effektivste¹⁹.

Ziconotide hemmt die Kommunikation zwischen den schmerzleitenden Nerven in der Peripherie des Körpers und den Nerven des zentralen Nervensystems²⁰. Das Conotoxin hemmt die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat in den Synapsen des Rückenmarks und unterdrückt so die Signalübertragung²⁰. Der Reiz aus der Peripherie kann dadurch das zentrale Nervensystem nicht erreichen und im Gehirn kein Schmerzempfinden auslösen²⁰. Spannungsabhängige Kalziumkanäle wurden als Zielproteine identifiziert²⁵ (Abb.3). Diese kommen in den presynaptischen Neuronen des Rückenmarks vor (Abb. 3, rechts oben). Hier steuern sie die spannungsabhängige Kalziumaufnahme und somit die Weiterleitung des Schmerzsignals zum Gehirn^{24,26}. Da sich das Conotoxin sehr schlecht im Gewebe verteilt, wird es über implantierte Pumpen oder Katheter direkt dem Subarachnoidalraum des Rückenmarks zugeführt²⁴. Ziconotide ist hochspezifisch für seinen neuronalen Rezeptor ($K_d = 9 \text{ pM}^{27}$) und hemmt die Neurotransmitterausschüttung ($K_i = 500 \text{ nM}^{28}$).

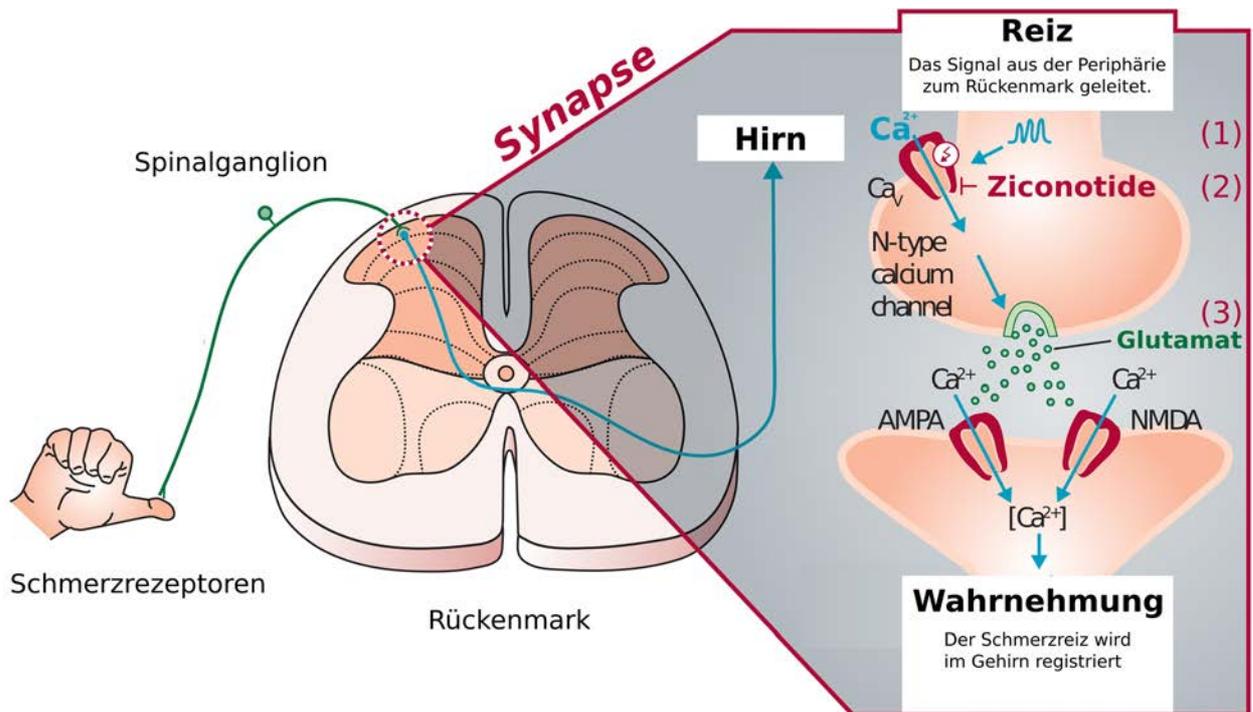


Abb 2: Einfluss von Ziconotide auf die Weiterleitung des Schmerzreizes zum Gehirn.

Der Schmerzreiz wird von seiner Quelle im Gewebe über afferente Neuronen zum Hinterhorn des Rückenmarks geleitet (**grün**). Hier wird die Information an die Neuronen des Rückenmarks übertragen, welche die Information in das Gehirn weiterleiten, wo der Schmerz als solcher wahrgenommen wird (**blau**). Synapsen im Rückenmark ermöglichen diese Übertragung (**roter Einschub**). Der Schmerzreiz führt am Ende des afferenten Neurons zur Depolarisierung der Membran und einem Einstrom von Kalziumionen (**1**). Diese führen zur Freisetzung von Glutamat, welches durch den synaptischen Spalt diffundiert und zur Depolarisierung der Neuronen im Rückenmark führt (**3**). Ziconotide hemmt die Schmerzleitung, indem es an N-Typ Kalziumkanäle bindet, welche überwiegend für den Kalziumeinstrom und somit die Freisetzung von Glutamat verantwortlich sind (**2**). Das Conotoxin hindert so die Neurotransmitterfreisetzung und somit die Stimulierung des postsynaptischen Neurons. Da in der Präsenz von Ziconotide das Schmerzsignal das Hirn gar nicht erst erreicht, empfindet der Patient keinen Schmerz. Die Grafik wurde übernommen und modifiziert von Schmidtko et al. 2010⁵.

5. Analytik

Für die Analytik von Conotoxinen steht keine kommerzielle Nachweismethode zur Verfügung. Massenspektrometrische Verfahren haben sich in der Analyse von Kegelschnecken Gift ausgezeichnet und werden deshalb als Methode der Wahl empfohlen. Die Technik eignet sich sowohl für komplexe Mischungen aus verschiedenen Giften²⁹ als auch für Einzelsubstanzen³⁰. Immunologische Nachweisverfahren werden erschwert durch die variablen Toxinstrukturen, das tiefe Molekulargewicht und die hydrophilen Oberflächeneigenschaften von Conotoxinen³⁰.

6. Anhang – Nomenklatur der Conotoxine

Conotoxine weisen in ihrer Aminosäuresequenz und Disulfidverbrückungen eine enorme Vielfalt auf. Strukturinformationen sind sehr komplex und oftmals nicht vorhanden, weshalb sich diese nicht als generelles Klassifizierungsmerkmal eignen. Die Nomenklatur nach Cysteinanordnung versucht Conotoxine nach dieser Eigenschaft zu klassifizieren (Abb. 3). Dabei stützt sich die Einteilung nur auf die Anordnung der Cysteine in der Aminosäuresequenz und nicht auf Disulfidverbindungen oder andere strukturelle Eigenschaften. Es ist dabei bemerkenswert, wie grundlegend unterschiedliche Cysteinstrukturen dieselben pharmakologischen Wirkungen entfalten können.

a)



b)

Klassifizierung			Zusatzinformationen	
Name	#Cysteine	Anordnung	Disulfidbrücken (Verbundene Cysteinpositionen)	Pharmakologische Familie
I	4	C - C - C - C	{I-III, II-IV}	α, ρ
II	6	CCC-C-C-C	{I-IV, II-V, III-VI}	α
III	6	C - C - C - C - C - C	{I-VI, II-IV, III-V}, {I-V, II-IV, III-VI}	$\alpha, \iota, \kappa, \mu$
IV	6	CC-C-C-C-C	{I-V, II-III, IV-VI}	α, κ, μ
V	4	CC-CC	{I-III, II-IV}	ϵ, μ
VI/VII	6	C - C - C - C - C - C	{I-IV, II-V, III-VI}	$\delta, \gamma, \kappa, \mu, \omega$
VIII	10	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C		α, σ
IX	6	C-C-C-C-C-C	{I-IV, II-V, III-VI}	
X	4	CC-C-C	{I-IV, II-III}	χ
XI	8	C-C-CC-CC-C-C	{I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII}	ι, κ
XII	8	C-C-C-C-CC-C-C		
XIII	8	C-C-C-CC-C-C-C		
XIV	4	C-C-C-C	{I-III, II-IV}	α, κ
XV	8	C-C-CC-C-C-C-C		
XVI	4	C-C-CC		
XVII	8	C-C-CC-C-CC-C		
XVIII	6	C-C-CC-CC		
XIX	10	C-C-C-CCC-C-C-C-C		
XX	10	C-CC-C-CC-C-C-C-C		α

Abb. 3: Conotoxinklassifizierung nach der Cysteinanordnung in der Primärstruktur

Eine mögliche Klassifizierung von Conotoxinen basiert auf der Anzahl und Anordnung der Cysteine in der Primärstruktur des maturierten Toxins. Dabei wird die Verbrückung der Cysteine zu Disulfidbindungen nicht berücksichtigt. Die Disulfidbindungen verschiedener Conotoxinstrukturen aus derselben Conotoxinklasse wurden überlagert um die Strukturelle Verwandtschaft zu demonstrieren (a). Eine zufällig ausgewählte Peptidsequenz wurde als Beispiel für jede der drei hervorgehobenen Toxinklassen abgebildet (PDB Zugangscode für I: 1k64, III: 1gib und VI/VII: 2cco). Disulfidbrücken wurden durch gelbe Verbindungslinien schematisch dargestellt. Die zwanzig heute bekannten Toxinklassen wurden in der Form einer Tabelle aufgelistet (b). In der dritten Spalte der Tabelle sind die bekannten Cysteinanordnungen aufgeführt, auf welchen die Einteilung basiert. Grafik übernommen und modifiziert aus Kaas et al. 2010⁴. Für die Strukturüberlagerungen verwendete Kaas et al. 2010⁴ jeweils 14, 7 und 13 Strukturen für die Toxinklassen I, III und VI/VII.

Bibliographie

- (1) Bruce, C.; Fitches, E.; Chougule, N.; Bell, H.; Gatehouse, J. *Toxicon* **2011**, *58*, 93.
- (2) Anderson, P. D. *Journal of pharmacy practice* **2012**, *25*, 121.
- (3) Chivian, E.; Roberts, C. M.; Bernstein, A. S. *Science* **2003**, *302*, 391.
- (4) Kaas, Q.; Westermann, J. C.; Craik, D. J. *Toxicon* **2010**, *55*, 1491.
- (5) Schmidtko, A.; Lotsch, J.; Freynhagen, R.; Geisslinger, G. *Lancet* **2010**, *375*, 1569.
- (6) Bingham, J. P.; Broxton, N. M.; Livett, B. G.; Down, J. G.; Jones, A.; Moczydlowski, E. G. *Anal Biochem* **2005**, *338*, 48.
- (7) Olivera, B. M.; Rivier, J.; Scott, J. K.; Hillyard, D. R.; Cruz, L. J. *The Journal of biological chemistry* **1991**, *266*, 22067.
- (8) Kaas, Q.; Yu, R.; Jin, A. H.; Dutertre, S.; Craik, D. J. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, D325.
- (9) Wu, X. C.; Zhou, M.; Peng, C.; Shao, X. X.; Guo, Z. Y.; Chi, C. W. *Peptides* **2010**, *31*, 1001.
- (10) Prashanth, J. R.; Brust, A.; Jin, A. H.; Alewood, P. F.; Dutertre, S.; Lewis, R. J. *Future Med Chem* **2014**, *6*, 1659.
- (11) Lewis, R. J.; Garcia, M. L. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 790.
- (12) Anderson, P. D.; Bokor, G. *Journal of Bioterrorism & Biodefense* **2012**, 2012.
- (13) Nelson, L. *Nature* **2004**, *429*, 798.
- (14) Olivera, B. M.; Gray, W. R.; Zeikus, R.; McIntosh, J. M.; Varga, J.; Rivier, J.; de Santos, V.; Cruz, L. J. *Science* **1985**, *230*, 1338.
- (15) Terlau, H.; Shon, K. J.; Grilley, M.; Stocker, M.; Stuhmer, W.; Olivera, B. M. *Nature* **1996**, *381*, 148.
- (16) Olivera, B. M.; Cruz, L. J. *Toxicon* **2001**, *39*, 7.
- (17) Fernandez, I.; Valladolid, G.; Varon, J.; Sternbach, G. *J Emerg Med* **2011**, *40*, 103.
- (18) Zajtchuk, R.; Bellamy, R. *Office of the Surgeon General, Department of the Army, United states of America* **1997**.
- (19) Stix, G. *Sci Am* **2005**, *292*, 70.
- (20) Mebs, D. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH* **2014**, 1. Auflage.
- (21) Garber, K. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 399.
- (22) Casewell, N. R.; Wuster, W.; Vonk, F. J.; Harrison, R. A.; Fry, B. G. *Trends Ecol Evol* **2013**, *28*, 219.
- (23) Lewis, R. J.; Dutertre, S.; Vetter, I.; Christie, M. J. *Pharmacol Rev* **2012**, *64*, 259.
- (24) Molinski, T. F.; Dalisay, D. S.; Lievens, S. L.; Saludes, J. P. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 69.
- (25) Olivera, B. M.; Cruz, L. J.; de Santos, V.; LeCheminant, G. W.; Griffin, D.; Zeikus, R.; McIntosh, J. M.; Galyean, R.; Varga, J.; Gray, W. R.; et al. *Biochemistry* **1987**, *26*, 2086.
- (26) Bowersox, S. S.; Gadbois, T.; Singh, T.; Pettus, M.; Wang, Y. X.; Luther, R. R. *J Pharmacol Exp Ther* **1996**, *279*, 1243.
- (27) Kristipati, R.; Nadasdi, L.; Tarczy-Hornoch, K.; Lau, K.; Miljanich, G. P.; Ramachandran, J.; Bell, J. R. *Mol Cell Neurosci* **1994**, *5*, 219.
- (28) Yeager, R. E.; Yoshikami, D.; Rivier, J.; Cruz, L. J.; Miljanich, G. P. *J Neurosci* **1987**, *7*, 2390.
- (29) Dutertre, S.; Jin, A. H.; Vetter, I.; Hamilton, B.; Sunagar, K.; Lavergne, V.; Dutertre, V.; Fry, B. G.; Antunes, A.; Venter, D. J.; Alewood, P. F.; Lewis, R. J. *Nat Commun* **2014**, *5*, 3521.
- (30) Fang, J.; Dong, F.; Wang, N.; He, K.; Liu, B.; Wu, S.; Li, A.; Zhang, X. *J Anal Toxicol* **2009**, *33*, 272.