

# Über das Gift der *Bothrops jararaca*.

Von  
H. Michl.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 24. Juli 1954.)

Mit 2 Abbildungen.

Das Gift von *Bothrops jararaca*, einer brasilianischen Giftschlange, wurde durch ein- und zweidimensionale Elektrophorese in Stärkeplatten und in trapezförmigen Papierstreifen zerlegt. Die einzelnen Fraktionen prüfte man auf ihre L-Aminosäureoxydase-, Adenosintriphosphatase-, Desoxyribonuklease-, Lecithinase-A- und Proteaseaktivität, auf ihre blutgerinnungsfördernden, hämolytischen und toxischen Eigenschaften, auf ihre Fähigkeiten zur Hemmung der Eidotterkoagulation und den Gehalt an „spreading factor“, sowie auf ihre Aminosäurezusammensetzung. Einige Zusammenhänge zwischen der enzymatischen Wirksamkeit und der Toxizität werden besprochen.

Die Schararaka (*Bothrops jararaca*) ist die verbreitetste Giftschlange Brasiliens. Bezüglich ihrer Gefährlichkeit steht sie an zweiter Stelle hinter der Klapperschlange<sup>1</sup>. Sie gehört zum Geschlecht der Lanzenschlangen (*Bothrops* oder *Lachesis*) in der Familie der Grubenottern (*Crotalinae*)<sup>2</sup>. Über die Zusammensetzung ihres Giftes weiß man — ähnlich wie bei anderen Giftschlangen — noch recht wenig, trotzdem eine Anzahl von chemisch bzw. enzymchemisch orientierten Arbeiten darüber vorliegen. Von den überwiegend chemisch orientierten Arbeiten seien die von *Klobusitzky* und *König* herausgehoben<sup>3</sup>. Diese Autoren

<sup>1</sup> *W. H. A. Schöttler*, J. Tropical Med. **31**, 489 (1951).

<sup>2</sup> *P. Bouquet*, Venins de serpents et antivenins. Paris. 1948.

<sup>3</sup> *D. von Klobusitzky* und *P. König*, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **179**, 204 (1935); **180**, 479 (1936); **181**, 387 (1936); **182**, 577 (1936); **192**, 271 (1939); Z. physiol. Chem. **255**, I (1938).

erkannten das Schararaka-Gift als ein kompliziertes Gemenge von Peptiden und Proteinen. Sie konnten durch fraktionierte Enteiweißung aus dem Rohgift eine toxische Substanz — das „Bothropotoxin“ — abtrennen und eine blutgerinnungsfördernde Komponente herstellen. Letztere besitzt einige medizinische Bedeutung, sie ist in Österreich unter dem Namen „Reptilase“<sup>4</sup> im Handel. Es liegen auch einige elektrophoretische Untersuchungen vor, so wurden die ersten papierelektrophoretischen Versuche überhaupt 1939 von *Klobusitzky* und *König* am Schararaka-Gift durchgeführt<sup>5</sup>. Mit der freien Elektrophorese arbeiteten *Goncalves*<sup>6</sup> und *Schöttler*<sup>7</sup>. In letzter Zeit haben *Grassmann* und *Hannig*<sup>8</sup> im Rahmen ihrer umfangreichen Versuche mit Schlangengiften auch das Schararaka-Gift der Papierelektrophorese unterworfen und die so erhaltenen Fraktionen auf vier Aktivitäten geprüft.

Das unfraktionierte Schararaka-Gift ist ferner mehrfach auf seine enzymatische Wirksamkeit untersucht worden<sup>9, 10, 11, 12</sup>. So wurde z. B. seine L-Aminosäureoxydase<sup>9, 10, 13</sup>, Adenosintriphosphatase<sup>10, 14</sup> (ATPase), Desoxyribonuklease<sup>12, 15</sup>, Lecithinase A (Phospholipase A)<sup>8, 10, 16</sup> und Protease<sup>8, 10, 17</sup>, seine blutgerinnungsfördernde<sup>4, 10, 18</sup> und hämolytische<sup>8</sup> Wirkung, seine Fähigkeit, die Eidotterkoagulation zu hemmen<sup>8</sup>, sein Gehalt an dem „spreading factor“<sup>17, 19</sup> und seine Toxizität<sup>1, 2, 7, 20</sup> bestimmt.

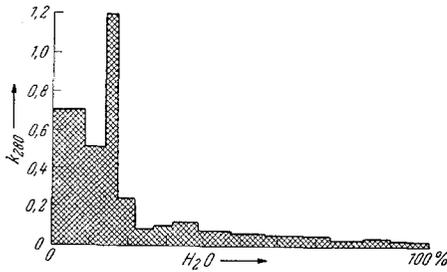
Diese bisherigen Arbeiten behandelten meist Teilprobleme und sind im wesentlichen erste Versuche zur Aufklärung des komplizierten Substanzgemisches, das das Schararaka-Gift darstellt. Die vorliegende Arbeit beabsichtigte, diese Kenntnisse zu erweitern. Dazu war es notwendig,

- 
- <sup>4</sup> *H. Bruck* und *G. Salem*, Wien. klin. Wschr. **66**, 395 (1954).  
<sup>5</sup> *D. von Klobusitzky* und *P. König*, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **192**, 273 (1939).  
<sup>6</sup> *J. M. Goncalves* und *L. G. Vieira*, An. Acad. Brasil. Ciênc. **22**, 141 (1950).  
<sup>7</sup> *W. H. A. Schöttler*, Bull. World Hlth. Org. **5**, 293 (1952).  
<sup>8</sup> *W. Grassmann* und *K. Hannig*, Z. physiol. Chem. **296**, 30 (1954).  
<sup>9</sup> *E. A. Zeller*, Advanc. Enzymol. **8**, 459 (1948).  
<sup>10</sup> *E. A. Zeller* in *J. B. Sumner* und *K. Myrbäck*, The Enzymes, Bd. I/2, S. 986. New York. 1951.  
<sup>11</sup> *K. Slotta*, Exper. **9**, 81 (1953).  
<sup>12</sup> *N. Porges*, Science **117**, 47 (1953).  
<sup>13</sup> *E. A. Zeller*, *B. Iselin* und *A. Maritz*, Helv. Physiol. Pharmacol. Acta **4**, 233 (1946).  
<sup>14</sup> *E. A. Zeller*, Helv. Chim. Acta **33**, 821 (1950).  
<sup>15</sup> *A. R. Taborda*, *L. C. Taborda*, *J. N. Williams Jr.* und *C. A. Elvehjem*, J. Biol. Chem. **195**, 207 (1952).  
<sup>16</sup> *W. Neumann*, Naturwiss. **41**, 322 (1954).  
<sup>17</sup> *E. Kaiser*, Mh. Chem. **84**, 482 (1953).  
<sup>18</sup> *D. von Klobusitzky*, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **213**, 361 (1951).  
<sup>19</sup> *G. Favilli*, Nature **145**, 866 (1940).  
<sup>20</sup> *W. H. A. Schöttler*, J. Immunol. **67**, 299 (1951).

das Gift in Komponenten aufzuspalten, diesen Komponenten bestimmte Enzymaktivitäten zuzuordnen, ihre Aminosäurezusammensetzung zu bestimmen und ferner nach Zusammenhängen zwischen enzymatischer Wirksamkeit und Toxizität zu suchen.

### Fraktionierung des Schararaka-Toxins.

1. Versuch der Darstellung des Bothropotoxins nach dem Verfahren von *Klobusitzky*<sup>21</sup>: Das Ergebnis war — vielleicht wegen zu kleiner Ansätze (max. 100 mg) — unbefriedigend. Die erhaltenen Produkte waren weitgehend inaktiv, aber elektrophoretisch keineswegs einheitlich.



b. 1.

2. Die Papierchromatographie nach *Zimmermann* und *Kludas*<sup>22</sup>: Man erhielt 2 scharfe Zonen, eine kräftige mit dem  $R_f$ -Wert 0,60 und eine schwächere mit einem von 0,87. Durch die Anwendung des Netzmittels waren beide Fraktionen inaktiv geworden.

3. Fraktionierte Fällung mit Alkohol: Das Ergebnis einer solchen zeigt Abb. 1 (UV-Absorption bei 2800 Å). Wie man sieht, sind wesentliche Teile des Giftes verhältnismäßig gut in wässrigem Alkohol löslich. Die Aktivitäten blieben weitgehend erhalten, auch wenn man ohne Kühlung arbeitete. Die Fraktionen waren elektrophoretisch sehr uneinheitlich.

4. Die besten Ergebnisse wurden mit der Elektrophorese in trapezförmigen Streifen bzw. in Stärkeplatten erzielt<sup>23, 24</sup>. Beide Methoden ergaben gute Ausbeuten an Aktivität (in Stärke bis zu 70%) und erleichterten wesentlich die Durchführung der enzymatischen Untersuchungen mit den geringen zur Verfügung stehenden Giftmengen. Die Elektrophorese in Stärkeplatten wurde vor allem deshalb angewendet, weil bestimmte Komponenten des Schlangengiftes — besonders bei längeren Versuchszeiten und niedrigerem pH — vom Papier adsorbiert wurden (z. B. Protease). Es war daher auch nicht immer ein direkter Vergleich der in Filtrierpapier oder in Stärke erhaltenen elektrophoretischen Verteilung möglich. Bei jedem Versuch mußte man ferner einen Kompromiß zwischen optimaler Auftrennung und der Ausbeute an Aktivität schließen. Um zufällige Übereinstimmungen der Wanderungsgeschwindigkeiten leichter erkennen zu können, erfolgten die elektro-

<sup>21</sup> *D. von Klobusitzky*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **180**, 479 (1936).

<sup>22</sup> *G. Zimmermann* und *K. H. Kludas*, Chem. Techn. **5**, 203 (1953).

<sup>23</sup> *H. Michl*, Naturwiss., **41**, 403 (1954).

<sup>24</sup> *H. Michl*, Mh. Chem. **85**, 1251 (1954).

phoretischen Untersuchungen bei 2 verschiedenen pH-Werten. Zur Ergänzung dieser Befunde wurde auch eine zweidimensionale Elektrophorese durchgeführt. Diese erfolgte auf 2 Arten: Einmal wurden die bei einem pH isolierten Fraktionen neuerlich bei einem anderen pH untersucht. Die zweite Möglichkeit bestand darin, daß die Trennung einmal in einer Richtung und das zweite Mal — ohne vorhergehende Isolierung — bei einem anderen pH normal dazu erfolgte. Die Ergebnisse der ersten Methode waren befriedigend, die Auftrennung nach der zweiten Methode in quadratischen Stärkeplatten ergab oft verschmierte Diagramme.

Die bei der elektrophoretischen Auftrennung erhaltenen Fraktionen wurden nun isoliert und auf ihre biologische Aktivität geprüft. Zur Bestimmung der einzelnen Aktivitäten wurden die empfindlichsten Methoden herangezogen. Es sei erwähnt, daß die ATPase und Desoxyribonuklease unter anderem durch die pH-Änderungen, die durch Freisetzen von Phosphorsäure aus dem Substrat eintritt und die man leicht mit einem Indikator erkennen kann, nachgewiesen wurde. Weiters ließ sich die L-Aminosäureoxydase durch Abfangen des gebildeten  $H_2O_2$  mit Cersalzen leicht erkennen.

#### Verteilung der Enzymaktivitäten (Abb. 2).

Die elektrophoretische Auftrennung bei pH 8,7 in Filtrierpapier zeigte nach Anfärben mit Bromphenolblau<sup>25</sup> bis zu 6 Komponenten. Nach der Absorption in UV (2800 Å), die nach einer Stärkeelektrophorese gemessen wurde, sind 4 Komponenten sichtbar. Gegenüber dem Bromphenolblaudigramm fehlen — soweit Vergleiche möglich sind — die zweitschnellste und eine langsame Komponente, während die anderen weitgehend korrespondieren. Die starke Differenz zwischen der UV-Absorption und der Anfärbung mit Bromphenolblau bei den langsamen Komponenten ist auf das Vorhandensein von nichtproteinartigen Bestandteilen zurückzuführen. Die Schwerpunkte der enzymatischen Aktivität drängten sich an drei Stellen des Elektrophoresediagrammes: an den beiden Enden und in der Mitte.

1. In der bei pH 8,7 am langsamsten wandernden Gruppe fand sich ein Teil der ATPase- und Desoxyribonuklease-Aktivität. Bei pH 6,3 war diese Fraktion in 3 Komponenten zerlegbar, wobei die Aktivitäten in der mittleren anzutreffen waren.

2. In den bei pH 8,7 mit mittlerer Geschwindigkeit wandernden Komponenten wurden folgende Aktivitäten nachgewiesen: ATPase, Lecithinase A, die Hauptmenge des blutgerinnungsfördernden Faktors und die toxische Komponente. Deutlich koinzidierten ATPase, Lecithi-

<sup>25</sup> H. G. Kunkel und A. Tiselius, *J. Gen. Physiol.* **35**, 89 (1951).

nase A und die toxische Komponente. Auch diese Fraktion war bei pH 6,3 nicht einheitlich, sie ließ sich in etwa 4 Komponenten zerlegen. Hierbei zeigte die langsamste und die zweitschnellste anodisch wandernde Fraktion ATPase, Lecithinase A und toxische Eigenschaften. Die schnellste Komponente war inaktiv und die mittlere förderte die Blutgerinnung.

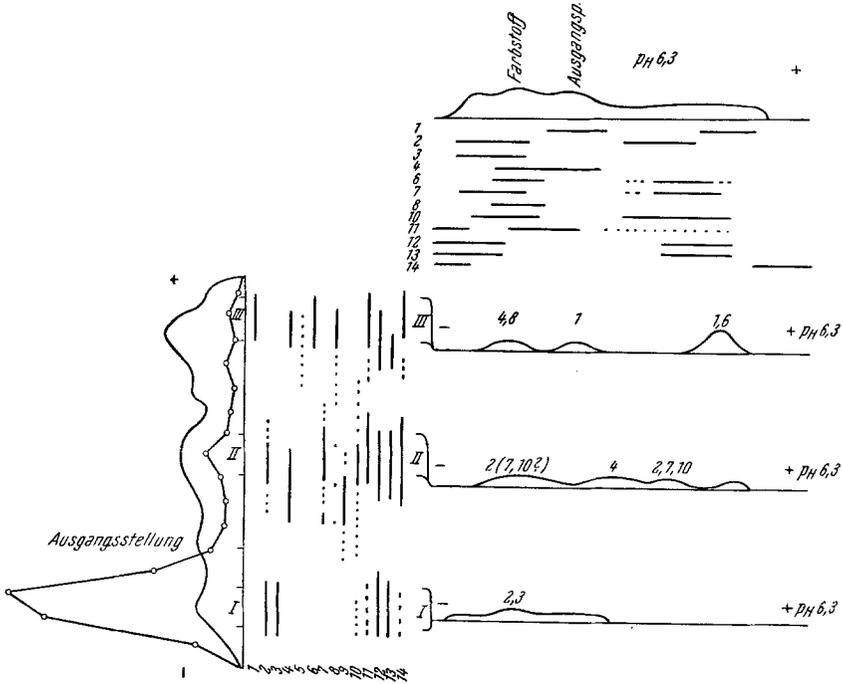


Abb. 2. 1 L-Aminosäureoxydase-Aktivität; 2 ATPase-Aktivität; 3 Desoxyribonuklease-Aktivität; 4 Förderung der Blutgerinnung; 5 Hämolyse (direkte); 6 Hemmung der Eidotterkoagulation; 7 Lecithinase-A-Aktivität; 8 Protease-Aktivität; 9 „spreading factor“; 10 Toxizität; 11 Argininhalt; 12 Cystin (nach Hydrolyse und Oxydation als Cystinsäure); 13 Prolin (nach Hydrolyse); 14 Tryptophan (Ehrlich-positive Stoffe). ~ Bromphenolblauanfärbung; —•—•— UV-Absorption (2800 Å); ——— starke, ..... schwache Aktivität.

Etwas langsamer als die Mittelfraktion 2 und sich überschneidend wanderte der „spreading factor“, also diejenige Komponente, die für das Ausbreiten des Giftes im Körper verantwortlich ist und die wahrscheinlich Hyaluronidaseaktivität besitzt.

3. In der bei pH 8,7 am schnellsten wandernden Fraktion waren: L-Aminosäureoxydase, Protease, ein Teil des blutgerinnungsfördernden Faktors und die Komponente, die die Eidotterkoagulation hemmt. Es deckten sich der blutgerinnungsfördernde Faktor mit der Protease sowie die Aminosäureoxydase mit der Hemmung der Eidotterkoagulation.

Diese schnellste Fraktion konnte bei pH 6,3 in 3 mit Bromphenolblau anfärbbare Komponenten zerlegt werden: in eine schwach kathodisch wandernde, eine langsam und eine schnell anodisch wandernde. Die letztere zeigt deutlich L-Aminosäureoxydase-Aktivität und Hemmung der Eidotterkoagulation. Die beiden langsamer wandernden Komponenten zeigten ebenfalls diese Reaktionen, aber merklich schwächer, sowie Proteaseaktivität und den blutgerinnungsfördernden Faktor. In der Gruppe der bei pH 8,7 schnell wandernden Substanzen befand sich auch ein Faktor, der eine direkte Hämolyse der roten Blutkörperchen hervorrief, jedoch so schwach, daß er nicht weiter untersucht wurde.

Untersuchte man das ursprüngliche Gift bei pH 6,3, so sieht man schon aus dem mit Bromphenolblau angefärbten Diagramm, daß die Auftrennung geringer als bei pH 8,7 ist. Die Aktivitäten drängten sich am Anfang und am Ende des Diagrammes zusammen, wobei sie meist an 2 Stellen gefunden wurden:

1. In der schwach kathodisch wandernden Gruppe fanden sich praktisch alle Aktivitäten, mit Ausnahme der L-Aminosäureoxydase, die in der Nähe des Ausgangspunktes blieb. Die Aktivitäten wanderten weitgehend mit einer Zone, die die Bromphenolblaufärbung während der ganzen Elektrophoresedauer beibehielt.

2. In der schnell anodisch wandernden Fraktion fanden sich wieder alle untersuchten Aktivitäten, mit Ausnahme der Protease und des blutgerinnungsfördernden Faktors. ATPase und Lecithinase A korrespondierten wie bei pH 8,7.

Schnitt man eine der beiden Zonen, die die Hauptaktivität enthielten, aus und ließ sie erneut beim gleichen pH 6,3 laufen, so spaltete sich jede Zone für sich wiederum in eine langsamer kathodisch und schneller anodisch wandernde Komponente. Das Verhalten der entsprechenden Komponenten deckte sich weitgehend. Eine ähnliche Verdoppelung der bei der Elektrophorese erhaltenen Zonen in der Nähe des IEP ist auch schon bei anderen Proteinen beobachtet worden.

Ließ man die bei pH 6,3 getrennten Fraktionen bei pH 8,7 einzeln laufen, so war erwartungsgemäß der Unterschied der nun erhaltenen Diagramme gering.

#### Verteilung der Aminosäuren.

Nach Oxydation mit Perameisensäure<sup>26</sup> konnten im Gesamtgift folgende Aminosäuren nachgewiesen werden:

Alanin	+++	Leucin und		Tyrosin	?
Arginin	+	Isoleucin	+++	Valin	++
Asparaginsäure	++	Lysin	++	?	+

<sup>26</sup> F. Sanger, *Biochemic. J.* 44, 126 (1949).

Cystinsäure	(+)	Phenylalanin	+	Tryptophan	
Glutaminsäure	+++	Prolin	(+)	(aus nicht	
Glycin	++	Serin	+	oxyd. Gift)	+
Histidin	+	Threonin	+		

Es ergaben sich folgende leichte Abweichungen vom normalen Bild eines Eiweißhydrolysats: Der Gehalt an Cystinsäure, Prolin und Tyrosin war gering. Ferner war eine wegen der geringen zur Verfügung stehenden Giftmenge nicht näher identifizierte ninhydrinpositive Substanz — etwa an der Stelle des Tryptophans im zweidimensionalen Papierchromatogramm — enthalten. Tryptophan selbst konnte es nicht sein, da der Fleck auch nach der Oxydation mit Perameisensäure auftrat und keine positive *Ehrlichsche* Reaktion gab. Es wurde nun qualitativ die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Fraktionen bestimmt. Diese zeigten deutliche Unterschiede bezüglich ihres Gehaltes an Arginin, Cystinsäure, Prolin und Tryptophan. Arginin trat bei der bei pH 8,7 erhaltenen Aufteilung hauptsächlich in der mittleren und schnellsten Fraktion auf. Cystinsäure und Prolin kamen hauptsächlich in den langsamsten, mittleren und schnellsten Fraktionen, also denen, die auch Enzymaktivität zeigten, vor. Entgegen dem Befund von *Klobusitzky* enthielt auch die toxische Fraktion, wenn auch geringe Mengen, Cystinsäure (nach Oxydation). Tryptophan bzw. *Ehrlich*-positive Stoffe waren hauptsächlich in den mittleren und schnellsten Fraktionen anzutreffen.

Bei pH 6,3 war Arginin vor allem in der kathodisch und in einer langsam anodisch sowie in geringerer Menge auch in den schneller wandernden Komponenten enthalten. Cystinsäure und Prolin fanden sich in kathodisch und anodisch wandernden Fraktionen etwa an der gleichen Stelle wie die biologischen Aktivitäten. *Ehrlich*-positive Stoffe waren in den kathodisch wandernden sowie in einer sehr schnell anodisch wandernden Fraktion anzutreffen. Bei letzterer dürfte es sich nicht um Tryptophan handeln, da die betreffende Komponente weder mit Bromphenolblau noch mit Ninhydrin stärker anfärbbar ist.

#### Toxizität.

Über die toxische Komponente läßt sich zusammenfassend folgendes sagen: Bei dem bei pH 8,7 erhaltenen Diagramm ist die Toxizität mit der mit mittlerer Geschwindigkeit wandernden Komponente verknüpft. Sie koinzidiert mit der Lecithinase A und dem Hauptteil der ATPase. Die am schnellsten wandernden Komponenten mit der L-Aminosäureoxydase erwiesen sich als praktisch ungiftig. Die am langsamsten wandernde Komponente, die ebenfalls einen Teil der ATPase und die Desoxyribonuklease enthält, war wesentlich weniger giftig als die mittlere Fraktion. Die Giftwirkung dürfte aber nicht auf das Vorhandensein

einer toxischen Substanz allein zurückzuführen sein. Die mittlere toxische Fraktion zeigte nämlich nur etwa ein Viertel der Giftwirkung einer entsprechenden Menge eines aufgetrennten und nachher wieder zusammengesetzten Schararaka-Toxins. Bei pH 6,3 war die Toxizität mit der kathodisch bzw. anodisch wandernden Gruppe der Enzymaktivitäten verknüpft. Sie war, wie aus der geringeren Auftrennung zu erwarten war, nur wenig niedriger als die einer äquivalenten Menge eines getrennten und dann wieder zusammengesetzten Schlangengiftes.

### Experimenteller Teil.

*Fraktionierte Fällung mit Alkohol:* Etwa 10 mg reines, gut homogenisiertes Schararaka-Toxin<sup>27</sup> löste man in 0,5 ml m/30 Phosphatpuffer von pH 7,6 und fällte mit 5 ml 95%igem Alkohol in Gegenwart von 100 mg gut gewaschener Kartoffelstärke. Nach 10 Min. zentrifugierte man scharf ab, dekantierte die überstehende klare Lösung, füllte sie mit dest. Wasser auf 8 ml auf und bestimmte die Extinktion bei 2800 Å gegen ein Puffer-Alkohol-Gemisch der gleichen Zusammensetzung. Den Rückstand, der Stärke, gefällttes Gift und etwas Puffersalze enthält, löste man in 0,75 ml m/30 Phosphatpuffer von pH 7,4 und fällte mit 4,75 ml 95%igem Alkohol. Der Rückstand wurde wieder abzentrifugiert und die Extinktion der überstehenden Lösung — wie oben beschrieben — bestimmt. Der ganze Vorgang wurde in der aus Abb. 1 ersichtlichen Weise noch 12mal wiederholt, wobei jedesmal der pH-Wert um 0,2 Einheiten erniedrigt worden ist.

*Elektrophorese in trapezförmigen Filtrierpapierstreifen*<sup>24</sup>: Ein trapezförmiger Filtrierpapierstreifen mit aufgesetzten Rechtecken (Höhe des Trapezes 20 cm, Basis 14 cm, obere Breite 2 cm) von SS 2043 b glatt wurde durch die Pufferlösung (Veronal, pH 8,7; 0,03 m oder Phosphat, pH 6,3; m/60)<sup>28</sup> gezogen, waagrecht in eine feuchte Kammer gespannt und einige mg Substanz in etwa 20 µl Puffer auf eine Linie in der Nähe der Basis aufgetragen. Man ließ nun 2 bis 3 Stdn. bei 400 V und 4 bis 5 mA laufen. Dann zerschnitt man den Streifen und isolierte die Substanz mit der bei<sup>29</sup> beschriebenen Methodik.

*Elektrophorese in Stärkeplatten*<sup>24</sup>: 20 g Kartoffelstärke schlemmte man mit 40 ml Puffer (Veronal, pH 8,7; 0,05 m; Borat-HCl, pH 8,5; 1:4 verd.; Phosphat, pH 6,3, m/60) auf, ließ etwa 30 Min. stehen, dekantierte und wiederholte den Vorgang 4mal. Nach dem letzten Dekantieren goß man die zähe, etwa 45% Wasser enthaltende Suspension auf eine Glasplatte, die 20 cm lang und 4 bis 6 cm breit war. Die so präparierte Platte trocknete man auf einem nivellierten, auf 50° erwärmten Messingblock, bis kein Puffer mehr überstand (etwa 10 Min.). Hierauf wurde durch leichtes Drücken mit einer Glasplatte eine Rinne normal zur Längsrichtung gemacht und in diese mit einer Kapillare 20 bis 50 µl einer mit Bromphenolblau leicht angefärbten Lösung von 5 bis 10 mg Schlangengift gegossen. Dann legte man eine Span-

<sup>27</sup> Für die Überlassung von Schlangengift sind wir Herrn Prof. Dr. *Dorival da Fonseca Ribeiro* vom Institut Butantan (Sao Paulo) zu großem Dank verpflichtet.

<sup>28</sup> *J. D'Ans* und *E. Lax*, Taschenbuch für Chemiker, S. 1592. Berlin: Springer-Verlag, 1943.

<sup>29</sup> *F. Sanger* und *H. Tuppy*, *Biochemic. J.* **49**, 463 (1951).

nung von etwa 400 V an, wobei bei Veronalpuffer 9 bis 10, bei Borat und Phosphatpuffer 6 bis 7 mA Strom durchflossen. Die Versuchsdauer lag bei 1 bis 2 Stdn., wobei sich die Substanz auf eine Strecke von 8 bis 16 cm ausbreitete. Diesen Bereich — der auch durch Abklatschen mit Filtrierpapier, Trocknen und Anfärben desselben genauer festgelegt werden kann — teilte man in 10 bis 20 Abschnitte und eluierte diese getrennt für enzymatische Untersuchungen mit etwa 1 ml physiologischer Kochsalzlösung oder Puffer, für den Aminosäurenachweis mit dest. Wasser.

*Zweidimensionale Elektrophorese:* Man fertigte ein Stärkeelektrophogramm in der eben beschriebenen Weise an. Dann schneidet man in der Längsrichtung einen 1 cm breiten Streifen aus und brachte ihn in eine entsprechende Rinne einer quadratischen Stärkeplatte mit einem pH von 6,3. Hierauf wurde 1 Std. lang gewartet, bis sich das pH einigermaßen ausgeglichen hatte, dann ließ man ein zweites Mal laufen. Die Lage der Substanzen wurde durch Abklatschen festgelegt.

#### Nachweis der Enzymaktivitäten.

*L-Aminosäureoxydase-Aktivität:* Zum Nachweis derselben wurde neben der manometrischen Methode<sup>9, 30</sup> ( $Q_{O_2}$ -Wert des Rohgiftes 18) auch versucht, das bei der Oxydation der Aminosäuren entstehende  $H_2O_2$  mit Cersalzen<sup>31</sup> abzufangen. Hierzu versetzte man 0,5 ml Eluat mit 0,5 ml eines klaren Hefekochsaftes. Dieser wurde durch 20 Min. langes Kochen von 15 ml dest. Wasser mit 5 g Bäckerhefe, die vorher mit dest. Wasser (10 ml) gewaschen worden war, Filtrieren und Zentrifugieren gewonnen. Dieser Zusatz ersetzte eventuell bei der Elektrophorese abgetrennte prosthetische Gruppen und hielt den Blindwert nieder. Nach dem Zufügen von 1 ml einer sterilen 0,02 m L-Leucinlösung (gleich 2,62 mg) wurde mit 1 ml einer Suspension von Cerhydroxyd (100 mg Cer[III]-sulfat löste man in etwa 2 ml 0,1 n  $H_2SO_4$ , fügte eine sterile 0,1 m Lösung von Veronal-Na bis zu einem pH von 7,2 — etwa 5 ml waren erforderlich — zu und füllte auf 10 ml auf) sowie einem Tropfen Toluol versetzt und 4 bis 12 Stdn. auf 37° erwärmt. Hernach zentrifugierte man den bei pos. Reaktion leicht gelb gefärbten Niederschlag ab, löste ihn in etwa 2 ml 1 n Schwefelsäure, fügte KJ und 1 Tropfen 0,1 n Ammonmolybdat hinzu und titrierte nach 5 Min. gegen Stärke mit 0,01 n Thiosulfat aus einer Mikrobürette. Der Gesamtverbrauch soll 200  $\mu$ l, der Blindwert, den man aus einer substratfreien Probe des gleichen Eluats bestimmte, 10  $\mu$ l nicht übersteigen. Die Ausbeute an L-Aminosäureoxydase nach einer Stärkeelektrophorese lag bei 60 bis 70% der Aktivität. Die Berechnung erfolgte nach einer mit dem Rohgift aufgestellten Eichkurve.

*ATPase-Aktivität:* Diese wurde zum Teil nach Zeller<sup>32</sup> bestimmt. Ein einfacher Nachweis gelang wie folgt: 0,5 ml Eluat + 1 ml einer 0,1%igen ATP (Na-Salz) Lösung + 1 Tropfen  $MgCl_2$ -Lösung (10 mg  $Mg^{++}/ml$ ) + 0,5 ml  $H_2O$  + 1 Tropfen Phenolphthaleinlösung (0,01%ig) und soviel 0,01 n NaOH, bis gerade Rotfärbung auftritt, wurden in einen Thermostaten von 37° gebracht. Die pos. Proben bleichten rasch aus und wurden alle 5 Min. mit einer gemessenen Menge 0,01 n NaOH bis zum Umschlag versetzt. Nach 30 Min. wurde der Gesamtverbrauch — er soll 200  $\mu$ l nicht übersteigen —

<sup>30</sup> Th. P. Singer und E. B. Kearny, Arch. Biochemistry 29, 190 (1950).

<sup>31</sup> H. Wieland und B. Rosenfeld, Ann. Chem. 477, 32 (1930).

<sup>32</sup> E. A. Zeller, Helv. Chim. Acta 32, 2512 (1949).

abgelesen. Nach Aufstellen einer Eichkurve mit dem Rohgift konnte eine Ausbeute von 55 bis 60% der Gesamtaktivität bestimmt werden.

*Desoxyribonuklease-Aktivität:* Die Bestimmung erfolgte genau wie oben, nur dienten 5 mg Thymonukleinsäure/Ansatz (hergestellt nach<sup>33</sup>) als Substrat und die Versuchsdauer lag bei 2 Stdn. Daneben versuchten wir auch die Methode nach<sup>34</sup>. Die Ausbeute lag bei 40 bis 50% der ursprünglichen Aktivität.

*Förderung der Blutgerinnung:* In die  $\frac{1}{2}$  ml fassenden Vertiefungen eines Plexiglasstreifens kamen 200  $\mu$ l von 1:5 mit 3,8%iger Na-Zitratlösung versetztem frischem Venenblut sowie 50  $\mu$ l eluiertes Schlangengift in physiologischer Kochsalzlösung. Darüber setzte man eine feuchte Kammer. Durch Durchziehen eines in Paraffinöl getauchten Glasfadens wurde das Auftreten des ersten Koagulums festgestellt. Daneben verwendete man auch die Methode von Quick<sup>35</sup>.

*Direkte Hämolyse:* Auf diese wurde wie bei Grassmann und Hannig<sup>8</sup> beschrieben<sup>8</sup> geprüft.

*Hemmung der Eidotterkoagulation:* Diese erfolgte nach der von Grassmann und Hannig<sup>8</sup> modifizierten Methode von Fleckenstein<sup>36</sup>.

*Lecithinase A (Phospholipase A):* Diese wurde im wesentlichen nach W. Neumann und E. Habermann<sup>37</sup> (hämolytische Wirkung von Lysolecithin) bestimmt. Die Messung erfolgte in einem Beckman-Spektralphotometer DU. Ausbeute: 50 bis 60%.

*Proteaseaktivität:* Die Bestimmung erfolgte viskosimetrisch mit Gelatine als Substrat nach der von Tuppy<sup>38</sup> modifizierten Methode von Northrop und Kunitz<sup>39</sup> bei dem von Kaiser empfohlenen pH von 8,2<sup>17</sup>. Das Rohgift hatte eine Aktivität von 21,5 visk. Einheiten bei diesem pH. Die Ausbeute nach der Stärkeelektrophorese war um 30%.

*„Spreading factor“:* In Anlehnung an Jaques<sup>40</sup> spritzte man männlichen Mäusen von etwa 20 g 0,07 ml Gift mit 0,03 ml 20%iger Hämoglobinlösung in physiologischer NaCl subkutan in den ausrasierten Rücken und beobachtete die Ausbreitung des Farbstoffes gegenüber Tieren, denen nur der Farbstoff unter vergleichbaren Bedingungen eingespritzt worden war.

*Toxizität:* Es wurde der Mäusetest mit jungen männlichen Mäusen von ungefähr 15 g Gewicht in der von Schöttler<sup>1, 7, 20</sup> beschriebenen Weise (subkutane Injektion dorsal) durchgeführt. LD 50 des Rohgiftes 16  $\gamma$ /g Maus.

*Aminosäuren:* Arginin und Tryptophan (bzw. Ehrlich-positive Stoffe) wurden zunächst direkt auf dem Elektropherogramm nach Tuppy<sup>41</sup> bzw. nach Tabone<sup>42</sup> et al. nachgewiesen. Der Nachweis der Cystinsäure und des Prolins erfolgte nach Oxydation mit Perameisensäure und 12stündiger

<sup>33</sup> B. Flaschenträger und E. Lenartz, Physiologische Chemie, Bd. I, S. 839. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag. 1951.

<sup>34</sup> M. Kunitz, J. Gen. Physiol. **33**, 349 (1950).

<sup>35</sup> A. J. Quick, J. Amer. Med. Assoc. **110**, 1658 (1938).

<sup>36</sup> A. Fleckenstein und B. Fettig, Z. Naturforsch. **6** b, 213 (1951).

<sup>37</sup> W. Neumann und E. Habermann, Z. physiol. Chem. **296**, 166 (1954).

<sup>38</sup> H. Tuppy, Mh. Chem. **84**, 996 (1953).

<sup>39</sup> J. H. Northrop und M. Kunitz, J. Gen. Physiol. **16**, 313 (1932).

<sup>40</sup> R. Jaques, Biochemic. J. **53**, 56 (1953).

<sup>41</sup> H. Tuppy, Mh. Chem. **84**, 342 (1953).

<sup>42</sup> J. Tabone, D. Robert und J. Troestler, Bull. soc. chim. biol. **30**, 547 (1948).

Hydrolyse mit 6 n HCl durch zweidimensionale Papierchromatographie (Butanol-Eisessig-Wasser, Phenol-Wasser), wie von *Slotta* und *Primosigh* für das Crotoxin<sup>43</sup> beschrieben. Die Anfärbung wurde mit Ninhydrin und Isatin<sup>44</sup> durchgeführt.

Dieser Arbeit kam eine Zuwendung zugute, welche die *Rockefeller-Foundation* dem Vorstand des II. Chemischen Laboratoriums der Universität Wien, Herrn Prof. Dr. *F. Wessely*, zur Unterstützung der unter seiner Leitung ausgeführten Arbeiten gewährt hat. Ich danke hierfür sowie für die Hilfe, die ich von der Österreichischen Akademie der Wissenschaften aus den Mitteln der *Seegen*-Stiftung erhalten habe.

---

<sup>43</sup> *K. Slotta* und *J. Primosigh*, *Memorias do Instituto Butantan* **23**, 51 (1951).

<sup>44</sup> *R. Acher*, *C. Fromageot* und *M. Justisz*, *Biochim. Biophys. Acta* **5**, 81 (1950).