

Vergleichende Untersuchungen von Schlangengiften

Von

H. Michl und Gertrude Kiss

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 8. Juli 1959)

Einige Schlangengifte wurden mit Hilfe der Elektrophorese in Stärkegel zerlegt und die so erhaltenen Fraktionen auf Enzymaktivitäten untersucht. Es ergaben sich deutliche Zusammenhänge zwischen der Stellung der betreffenden Schlangenart in der zoologischen Systematik und der Zusammensetzung der Gifte.

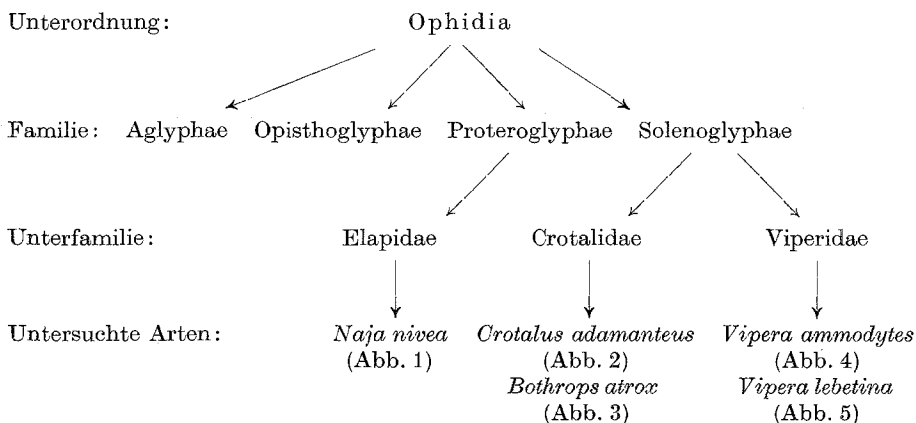
Schlangengifte sind komplizierte Proteingemische und ihre Zerlegung bereitet noch immer erhebliche Schwierigkeiten¹. *Smithies* veröffentlichte 1955 ein elektrophoretisches Verfahren², das bei der Untersuchung von Sera wesentlich bessere Auftrennungen ergab als die üblichen Methoden. Wir wollten nun versuchen, ob dieses Verfahren auch bei Schlangengiften Vorteile bietet und ob eine verbesserte Auftrennung Zusammenhänge zwischen der Zusammensetzung der Gifte und der Art der betreffenden Tiere erkennen läßt.

Zur Untersuchung gelangte ein *Proteroglyphen*-gift und vier *Solenoglyphen*-gifte, und zwar von zwei *Crotaliden* (Lochottern) und zwei *Viperiden* (echte Ottern) (vgl. Tab. 1). Bei dem *Proteroglyphen*-gift handelte es sich um das Gift der *Elapiden*-art *Naja nivea* (Kapkobra), die im Bereich der Südafrikanischen Union lebt; das von uns untersuchte Gift stammte allerdings von in Europa gezüchteten Tieren. Die *Crotaliden*-gifte kamen von *Bothrops atrox* (Lanzenschlange), deren Verbreitungsgebiet sich von Zentralamerika bis nach Brasilien erstreckt, und von *Crotalus adamanteus* (Diamantklapperschlange), die im südöstlichen Teil

¹ Vgl. *E. Kaiser* und *H. Michl*, Die Biochemie der tierischen Gifte, F. Deuticke, Wien 1958.

² *O. Smithies*, Nature [London] **175**, 307 (1955); Biochem. J. **61**, 629 (1955).

Tabelle 1



der USA beheimatet ist. Von den *Viperiden* wurde ein Gift der in den Südlichen Kalkalpen vorkommenden *Vipera ammodytes* (Sandotter) und eines der nahe verwandten Art *Vipera lebetina* (Levanteotter), die über Nordafrika und den Nahen Osten verbreitet ist, untersucht.

Die Elektrophorese im Stärkegel — also in puddingartig gequollener Stärke — erfolgte in weitgehender Anlehnung an *Smilgies*². Von großer Bedeutung war die Art der verwendeten Stärke und es erwies sich als unbedingt notwendig, jeden Hydrolyseansatz erneut zu testen. Die untersuchten Schlangengifte ließen sich unter vergleichbaren Bedingungen deutlich besser auftrennen als bei der Papierelektrophorese oder der Elektrophorese in Stärkepulver (nicht gequollener Stärke)³. Vor allem war es mit Hilfe der Stärkegel-Methode in vielen Fällen möglich, eine gute Trennung auch von alten Giften zu erreichen, und zwar so, daß zwischen den aufgetrennten Fraktionen proteinfreie Zonen waren. Die elektroosmotischen Erscheinungen waren ferner vernachlässigbar klein. Für eine präparative Darstellung der einzelnen Komponenten eignete sich diese Methode weniger; so konnte z. B. von der Aminosäuredehydrogenase-aktivität etwa 10% gewonnen werden. Eine Verbesserung der Ausbeute ist durch Einwandernlassen der betreffenden Fraktion in Glaspulver⁴ möglich.

Es wurde versucht, einzelne Fraktionen durch Bestimmung ihrer Enzymaktivität näher zu charakterisieren. Im einzelnen wurde das elektrophoretische Verhalten der L-Aminosäure-dehydrogenase (L-Aminosäureoxydase), Phospholipase A, Protease, sofern sie Gelatine abbaut, und des Faktors, der die Dotterkoagulationshemmung verursacht (z. T. Phospholipase A) untersucht.

³ H. Michl, Mh. Chem. **85**, 1240 (1954).

⁴ Th. Wieland, G. Pfeleiderer und H.-L. Rettig, Angew. Chem. **70**, 341 (1958).

Abb. 1—5 zeigen einige Trennungen bei pH 8,4. In eindeutiger Weise nahm der Anteil der bei diesem pH kathodisch wandernden Fraktionen von dem *Elapiden*-gift (*Naja nivea*) zu den *Crotaliden*- (*Bothrops atrox*, *Crotalus adamanteus*) und schließlich *Viperiden*-giften (*Vipera ammodytes*, *Vipera lebetina*) ab. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen¹ wanderte der Großteil des *Naja*-giftes zur Kathode, während die *Solenoglyphen*-gifte mehr anodisch wandern. Der Anteil der basischen Fraktionen ist ferner bei den *Crotaliden* größer als bei den *Viperiden*. Man kann also auf Grund dieser elektrophoretischen Untersuchungen die Gifte der *Elapiden*, *Crotaliden* und *Viperiden* einwandfrei unterscheiden.

Zur einfachen Charakterisierung des Verhaltens der Enzyme bei der Elektrophorese wurde die relative, auf den Farbstoff Bromchlorphenolblau (Dibromdichlorphenolsulfophthalein) bezogene Wanderungsgeschwindigkeit (d. h. Weg des Enzyms/Weg des Bromchlorphenolblaus) bestimmt. Aus den Abb. 1—5 lassen sich die entsprechenden Werte ablesen.

Die in *B. atrox*, *V. lebetina* und *V. ammodytes* nachgewiesenen L-Aminosäure-dehydrogenasen zeigten bei der Elektrophorese praktisch keinen Unterschied, und das wäre bei so nahe verwandten Arten auch nicht zu erwarten. Aus der Reihe fällt, wenn man vom *Naja*-gift absieht, die L-Aminosäure-dehydrogenase des *Crotalus*-giftes. Diese erstreckt sich über eine breite Zone des Elektropherogrammes und zeigt eine Schwanzbildung in der Wanderungsrichtung, die bis zu der schneller wandernden Komponente reicht. Solche Erscheinungen treten bei Elektrophoreseversuchen immer dann auf, wenn eine schneller wandernde Substanz von einer langsamer wandernden zurückgehalten und erst im Laufe des Versuches freigegeben wird. Unabhängig davon ist die gegenseitige Adsorption von Proteinen in Schlangengiften schon mehrfach nachgewiesen worden¹. So stellt z. B. das aus *Crotalus*-gift isolierte Crotoxin⁵ eine definierte Verbindung eines toxischen Prinzipes (Crotactin) und einer Phospholipase A dar^{6, 7}.

Die in den vorliegenden Giften nachgewiesenen Enzyme machen mengenmäßig gegenüber den anderen Proteinen nicht viel aus, es fallen deshalb die Stellen stärkster Enzymaktivität nur ausnahmsweise mit den mit Amidoschwarz sichtbar gemachten Proteinfractionen zusammen (Abb. 1—5). Es ist deshalb verständlich, daß die besprochenen Adsorptionserscheinungen zum mehrfachen Auftreten der gleichen Enzymaktivität führen können.

⁵ K. H. Slotta und H. L. Fraenkel-Conrat, Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1076 (1938).

⁶ K. H. Slotta, Fortschr. Chem. org. Naturst. [Wien] **12**, 406 (1955).

⁷ W. P. Neumann und E. Habermann, Biochem. Z. **327**, 170 (1955).

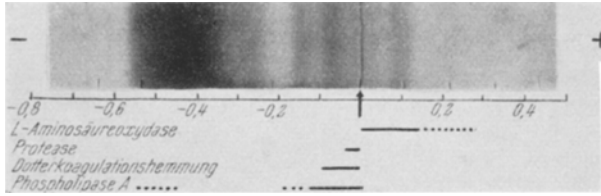


Abb. 1. *Naja nivea*

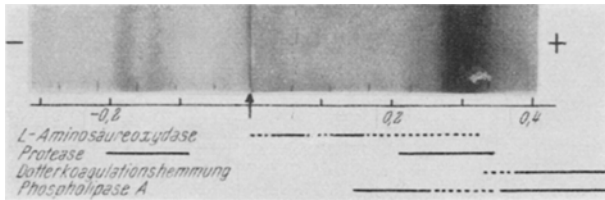


Abb. 2. *Crotalus adamanteus*

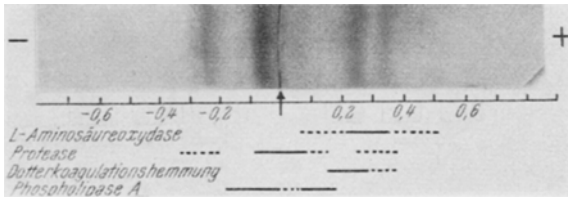


Abb. 3. *Bothrops atrox*

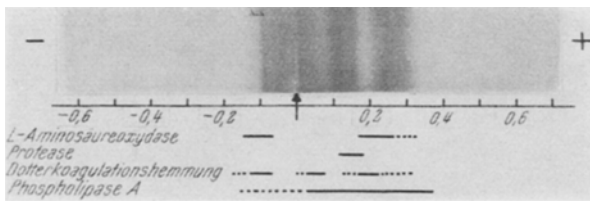


Abb. 4. *Vipera ammodytes*

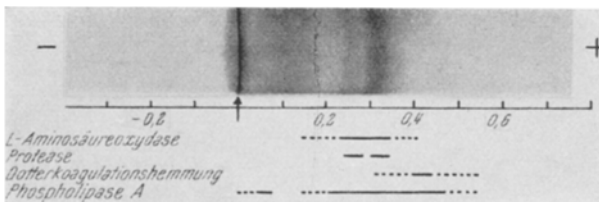


Abb. 5. *Vipera lebetina*

Experimenteller Teil

Herstellung des Stärkegels und Durchführung der Elektrophorese: Die Hydrolyse der Stärke und die Bereitung des Gelstreifens wurde in weitgehender Anlehnung an *Smithies*² durchgeführt. Es wurde käufliche Kartoffelstärke mit einem Gemisch von konz. HCl und Aceton (1:100) verschieden lang hydrolysiert und die einzelnen Produkte mit menschlichem Serum auf maximale Auflösung getestet. Die optimale Hydrolysendauer lag bei 2½ Stdn.

Zur Herstellung des Gelstreifens kochte man 14 g hydrolysierte Stärke in 100 ml Na-Veronal/HCl-Puffer (pH 8,9) kurz auf und goß das Gel in eine geeignete Form; der pH im Gel lag bei 8,4.

Das Gift (ca. 3—6 mg) wurde in etwas Puffer gelöst, mit Bromchlorphenolblau angefärbt und ein mit dieser Lösung getränkter Filterpapierstreifen in das Gel eingebracht.

Die Elektrophorese wurde bei ca. 2 V/cm während ungefähr 16 Stdn. auf einer mit Leitungswasser gekühlten Glasplatte durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der Streifen, wie von *Smithies*² beschrieben, durchgeschnitten, die eine Hälfte mit einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz 10B in Methanol-Eisessig-Wasser = 5:1:5 angefärbt, die andere Hälfte zur Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendet. Um der bei der Anfärbung auftretenden Schrumpfung des Streifens Rechnung zu tragen, wurde der anzufärbende Streifen am Rande mit kleinen Einschnitten im Abstand 1 cm versehen (Abb. 1—5).

Protease-Aktivität: 4 g Gelatine löste man auf dem Wasserbad in 100 ml 1:1 verdünntem Na-Veronal/HCl-Puffer (pH 8,9) auf und goß einen ca. 4 mm dicken, 25 mm breiten Gelatinestreifen. Nach dem Erstarrenlassen wurde ein 10—15 mm breiter Elektrophoresestreifen daraufgelegt und 16—24 Stdn. bei Zimmertemp. liegen gelassen. Dann entfernte man den Stärkegelstreifen, wusch die Gelatine mit Wasser und konservierte sie durch halbstündiges Einwirkenlassen einer 3proz. Formaldehydlösung.

Die Lage von proteolytischen Fermenten wird durch deutliche Einbuchtungen im Gelatinestreifen angezeigt.

Die *L-Aminosäuredehydrogenase-Aktivität* bestimmte man mit Leucin als Substrat, Abfangen des gebildeten Wasserstoffperoxyds mit Ce(III)-Ion und nachfolgende jodometrische Titration³. Statt des Eluates wurden 5 mm breite Stärkegelfractionen verwendet.

Auf die *dotterkoagulationshemmende Wirkung* wurde — ebenfalls unter Verwendung von 5 mm breiten Fractionen — nach der von *Grassmann* und *Hannig* modifizierten Methode von *Fleckenstein*^{8, 9} geprüft.

Zur Bestimmung der *Phospholipase A-Aktivität* wendete man die Methode nach *Grassmann* und *Hannig*⁹ an, nach der Eidotter als Substrat verwendet und die hämolytische Wirkung des bei der Bebrütung entstehenden Lysolecithins photometrisch bei 540 m μ im Beckman-Spektrophotometer gemessen wurde.

Für die großzügige Überlassung von Giften sind wir Herrn Professor Dr. K. H. *Slotta* (Miami) und Herrn Dr. H. W. *Raudonat* (Frankfurt) zu großem Dank verpflichtet.

Dieser Arbeit kam ferner eine Zuwendung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften zugute, wofür an dieser Stelle herzlichst gedankt sei.

⁸ A. *Fleckenstein* und B. *Fettig*, Z. Naturforschg. **6b**, 213 (1951).

⁹ W. *Grassmann* und H. *Hannig*, Z. physiol. Chem. **296**, 30 (1954).