

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe - Universität  
Frankfurt am Main

Zentrum der Rechtsmedizin

Vergleichende enzymatische Untersuchungen an Schlangengiften von  
*Bothrops asper* und *Crotalus atrox*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Katrin Langhammer

aus Grünstadt

Frankfurt am Main 2004

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter  
Referent: Prof. Dr. D. Mebs  
Koreferent: Prof. Dr. H. W. Doerr

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2004

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	3
1.1 Giftschlangen .....	4
1.2 Schlangengifte.....	8
1.3 Giftschlangenbisse .....	14
1.4 Behandlung von Giftschlangenbissen.....	17
1.5 Problemstellung .....	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Schlangengifte.....	23
2.1.1 <i>Bothrops asper</i> .....	23
2.1.2 <i>Crotalus atrox</i> .....	25
2.2 Geräte und Chemikalien .....	27
2.3 Enzymbestimmungen.....	28
2.3.1 Argininester-Hydrolase-Aktivität .....	28
2.3.2 Casein-Hydrolyse-Aktivität .....	28
2.3.3 Hide-Powder-Azure-Aktivität.....	29
2.3.4 Fibrinogen-Koagulase-Aktivität .....	30
2.3.5 Humanplasma-Koagulase-Aktivität.....	30
2.3.6 L-Aminosäureoxidase-Aktivität .....	30
2.3.7 Phosphodiesterase-Aktivität .....	31
2.3.8 Phospholipase A <sub>2</sub> -Aktivität.....	32
2.3.9 Fraktionierung der Gifte von <i>Bothrops asper</i> .....	32
3 Ergebnisse .....	34
3.1 Rohgifte .....	34
3.1.1 Argininester-Hydrolase .....	35
3.1.2 Casein-Hydrolyse .....	37
3.1.3 Hide-Powder-Azure .....	39
3.1.4 Fibrinogen-Koagulase.....	41
3.1.5 Humanplasma-Koagulase .....	43
3.1.6 L-Aminosäureoxidase .....	45
3.1.7 Phosphodiesterase .....	47
3.1.8 Phospholipase A <sub>2</sub> .....	49
3.2 Fraktionierung der Gifte durch Anionenaustausch-Chromatographie.....	55
3.2.1 Casein-Hydrolyse.....	55
3.2.2 Humanplasma-Koagulase .....	55
4 Diskussion.....	73
5 Zusammenfassung.....	81
6 Abstract.....	82
7 Literaturverzeichnis .....	83

## **1 Einleitung**

„Aber die Schlange war listiger als alle Tiere auf dem Felde, die Gott der Herr gemacht hatte [...]“ [1. Mose 3, 1]. Die einen empfinden beim bloßen Gedanken an sie Angst und Ekel, andere sind gar fasziniert und wieder andere müssen sich im alltäglichen Leben mit der Gefahr, die mitunter von Schlangen ausgeht, auseinandersetzen.

Allerdings wird nicht jede Schlange der Gefährlichkeit, die man ihr zuschreibt auch gerecht: Von den rund 2700 bekannten Arten zählen nur etwa 20 % zu den giftigen Schlangen [Parker u. Grandison 1977; Underwood 1979; Phelps 1989; Bauchot 1994; Greene 1997]. Schlangengifte sind nicht nur von großem klinischen, sondern auch biochemischem Interesse. So herrscht sowohl in der Normalbevölkerung als auch unter (Hobby-) Herpetologen und nicht zuletzt in der Medizin zum Teil viel Unwissen bezüglich Schlangenbiss-Verletzungen und deren Behandlung. Darüber hinaus stellen die Gifte ein biologisches Konzentrat aus sehr aktiven Enzymen und Toxinen dar, die für die Forschung vor allem auch auf dem Gebiet der Medizin von großer Bedeutung sein könnten [Zeller 1966]. Wenn man pharmakologisch aktive Fraktionen als Forschungs- oder Therapie-Instrument aus einem Rohgift herstellen möchte, sollte das Gift dafür ausgewählt werden, das besonders reichhaltig an der gewünschten Komponente ist [Schenberg 1959; Sadahiro u. Omori-Satoh 1980; Mebs u. Kornalik 1984; Jayanthi u. Veerabasappa 1988]. Bei der Analyse wie bei der Behandlung von Bissen durch Giftschlangen muss beachtet werden, dass die Gifte in ihrer Zusammensetzung nicht nur von Art zu Art, sondern ebenso auf Spezies- und Subspezies-Niveau und von Schlange zu Schlange sehr unterschiedlich sein können. So widmete sich ein Experten-Komitee der WHO 1981 der Aufgabe, Schlangengifte zu charakterisieren und katalogisieren [WHO 1981]. Perez et al. erstellten 2001 ein Serpentarium, das Schlangengifte von elf in den USA vorkommenden Spezies beschreibt. Viele Arten sind jedoch kaum untersucht oder die Erkenntnisse lückenhaft, so dass weder mit den Giften systematisch geforscht noch Verletzungen standardisiert behandelt werden können.

## 1.1 Giftschlangen

Giftschlangen kommen in vier verschiedenen Schlangenfamilien vor:

- **Viperidae, Vipern oder Ottern**

Azemiopsinae: nur eine Art; *Azemiops feae*

Viperinae, echte Vipern oder Ottern

Crotalinae, Grubenottern: zum Beispiel *Bothrops*, südamerikanische  
Lanzenottern oder *Crotalus* und *Sistrurus*, amerikanische Klapperschlangen

- **Atractaspididae, Erdvipern**

- **Elapidae, Giftnattern**

Elapinae, eigentliche Giftnattern: zum Beispiel *Naja*, Kobras; *Dendroaspis*,  
Mambas; *Bungarus*, Kraits; *Micrurus*, Korallenschlangen

Hydrophiinae, Ruderschwanzseeschlangen

Laticaudinae, Plattenschwanzseeschlangen

- **Colubridae, Nattern**

Schlangen sind poikilotherm; das heißt sie haben nicht die Möglichkeit, ihre Körpertemperatur konstant zu halten. So sind Schlangen gezwungenermaßen einem zirkadianen Aktivitätsrhythmus unterworfen. Ist es für sie nachts oftmals zu kalt, so wärmen sie sich in der Morgensonne auf, um sich anschließend bewegen und der Jagd widmen zu können. Da Schlangen in den gemäßigten Zonen einen Winterschlaf halten, kommt es in der kalten Jahreszeit eher selten zu Bissverletzungen.

Als äußerliche Erkennungsmerkmale sind die lange gefurchte retraktile Zunge und die besondere „Haut“ der Schlangen zu nennen. Die Schuppen können als eine Art „verdickte und verhärtete Haut“ angesehen werden, die dem Tier zum einen Schutz und zum anderen erhöhte Flexibilität (die Schuppen sind gegeneinander beweglich) bietet. Die Häutung, die in ihrer Frequenz und Art von dem Alter einer Schlange abhängt, wird durch diverse chemische und hormonelle Veränderungen im Organismus eingeleitet. Beginnend am Kopf wird bei diesem Vorgang das gesamte Stratum corneum als eine normalerweise zusammenhängende Schicht

abgestoßen. Innerhalb von Minuten bis Stunden streift die Schlange regelrecht ihre alte Haut ab.

Da Schlangen keine externe Öffnung des Gehörgangs besitzen, sind sie folglich nicht sensibel für Geräusche. Im Gegensatz dazu können sie jedoch gut Vibrationen des Bodens vernehmen. Desweiteren besitzen Schlangen keine beweglichen Augenlider, sondern eine transparente Schicht, die das Auge bedeckt und schützt.

Im Oberkiefer befindet sich bei Giftschlangen auf jeder Seite je eine Drüse, homolog einer Speicheldrüse, die das Schlangengift produziert und zugleich speichert. Das Gift der Schlange gelangt zuerst durch den Hauptgang in eine akzessorische Drüse und von dort aus weiter zum Giftzahn. Die Aufgabe der Nebendrüse ist unklar.

Giftschlangen sind mit unterschiedlichen Giftapparaten ausgerüstet und werden entsprechend eingeteilt [Mebs 1977]:

- Eine **aglyphe** (also ungefurchte) Bezahnung zeichnet die meisten Nattern (Colubridae) aus. Da ihr Giftsekret aus der Duvernoyschen (der Gift-) Drüse kommend lediglich in Schleimhauttaschen in Nachbarschaft der Zähne mündet, sind diese Schlangen darauf angewiesen, ihre Beute länger festzuhalten, um sie auch tatsächlich mit dem Gift in Kontakt zu bringen.
- Andere Colubriden weisen eine **opisthoglyphe** Bezahnung auf (ihre hinterständigen Zähne sind gefurcht). Hier mündet der Ausführungsgang der Giftdrüse im hinteren Bereich des Oberkiefers an der Basis vergrößerter, nach frontal gefurchter Zähne. Der Mensch (als potentiell Opfer der Schlange) kommt mit den im Kiefer weit hinten liegenden Giftzähnen nur ausnahmsweise in Kontakt.
- Elapiden besitzen beidseits jeweils einen vorderständigen Zahn, dessen Furche geschlossen, der Zahn somit hohl ist: Sie sind **proteroglyph**. Das giftige Sekret gelangt von der im hinteren Kopfbereich liegenden Drüse über einen Ausführungsgang und durch den röhrenförmigen Zahn in die Beute.

- **Solenoglyph** bezahnt sind die Viperiden. Ihre Röhrenzähne sind an dem auf einen Knochen teilreduzierten Oberkiefer befestigt, so dass sie durch Rotation des kurzen Maxillare zum Biss aufgestellt werden können. Die stark vergrößerten Fangzähne stellen perfekte Injektionsnadeln dar.

Schlangen, die proteroglyph oder solenoglyph bezahnt sind, können durch Muskelkontraktion die Injektion von Gift steuern. Bei einem normalen Beutebiss werden nur circa zehn Prozent der Giftreserven aus der Drüse abgegeben [Kochva 1987]. Eine Klapperschlange erneuert regelmäßig alle sechs bis zehn Wochen jeweils einen ihrer Giftzähne. Abgebrochene Zähne können oft innerhalb von Tagen ersetzt werden [Klauber 1956].

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Gifte zweier Crotalinae (Grubenottern): die amerikanische Klapperschlange (*Crotalus atrox*) und die südamerikanische Lanzenotter (*Bothrops asper*).

Grubenottern zeichnen sich durch ein besonderes Wärmesinnesorgan aus, das Grubenorgan, welches sie zum Aufspüren von Beutetier sogar in völliger Dunkelheit befähigt. Dieses ist empfindlich für Infrarotstrahlen und liegt als paariges Organ jeweils in einer Einbuchtung zwischen Auge und Nasenöffnung. Nicht zuletzt aufgrund dieses besonderen Organs zählen die Grubenottern zu den am höchsten entwickelten Giftschlangen [Mebs 2000].

Die Klapperschlangen (mit den beiden Gattungen *Crotalus* und *Sistrurus*) zeichnen sich in erster Linie durch eine an ihrer Schwanzspitze befindlichen „Klapper“ aus, die in Einzelfällen allerdings auch fehlen kann. Vibriert der Schwanz der Schlange, so ist ein rasselndes Geräusch; eine Art „Warnhinweis“ zu hören. Die Klapper oder Rassel besteht aus selten mehr als 16 keratinhaltigen Hornringen [Russell 1980b], die Reste der Häutung darstellen und locker miteinander verbunden sind. Alle 50 bis 400 Tage wird ein neues Element am Ende des Schwanzes angefügt [Klauber 1956].

Die Texas-Klapperschlange *Crotalus atrox* zählt mit 2 bis 2,5 m Körperlänge zu den großen Arten unter den Klapperschlangen [Mebs 2000]. In Nordamerika wird *C. atrox* seit ihrer Erstbeschreibung im Jahre 1853 durch Baird und Girard als „Western diamondback rattlesnake“ oder auch als „Coontail“ (also „Waschbärschwanz“) bezeichnet und damit bereits auf ihr Aussehen hingewiesen [Klauber 1956]: Zum einen trägt sie eine Zeichnung auf dem Rücken, die perlschnurartig jeweils mit den Ecken aneinander gereihten Vierecken („Diamanten“) entspricht, und zum anderen ist der Schwanz abwechselnd grauschwarz geringelt. Die tag-, aber auch nachtaktiven Tiere sind, ebenso wie die Lanzenottern, ovovivipar, das heißt, die Jungtiere schlüpfen noch unter der Geburt aus der Eihülle. *Crotalus*-Arten bevorzugen trockenes, steiniges Gebiet, wo sie sich in Erdhöhlen und Steinspalten zurückziehen können. Sie sind aber auch in feuchten Wäldern zu finden. Selbst in Höhen bis fast 4000 m kann man sie antreffen [Mebs 2000]. Schlangen der Gattungen *Crotalus* und *Sistrurus* sind in Nord-, Mittel- und Südamerika verbreitet.

Zur Unterfamilie der Crotalinae zählen auch Arten der Gattung *Bothrops*; die südamerikanischen Lanzenottern. Ihren Namen haben sie aufgrund ihrer Kopfform, die sich deutlich vom restlichen Körper abhebt. Lanzenottern besitzen im Gegensatz zu ihren Verwandten aus der Unterfamilie der Grubenottern keine Klappern. Die meisten *Bothrops*-Arten sind kleiner als 2 m und streifig und fleckig dunkel gezeichnet [Mebs 2000]. Einige Arten leben in trockenen Savannen, andere im Regenwald auf dem Boden, aber auch auf Zweigen und Ästen. Verbreitet sind Lanzenottern über Mittel- und Südamerika, in Nordamerika sind sie nicht vertreten.

## ***1.2 Schlangengifte***

Schlangengifte bestehen überwiegend aus Proteinen und Polypeptiden, die für deren toxische oder enzymatische Eigenschaften verantwortlich sind. Einen geringeren Anteil machen Nukleotide, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Lipide und anorganische Spurenelemente aus [Mebis 1974; Freyvogel u. Meier 1982].

Die Zusammensetzung des Giftes variiert nicht nur von Art zu Art, sondern auch innerhalb einer Schlangenpopulation. Weiterhin können das Alter der Schlange, ihr Geschlecht, ihre geographische Herkunft, die Ernährung, die Haltungsbedingungen und auch die Häufigkeit der Giftentnahme die Zusammensetzung und die Konzentration des Sekretes beeinflussen [Mebis 1970]. So fand man, dass die Umgebungstemperatur einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung des Giftes einer Schlange hat: *C. atrox* produziert im Winter weniger Gift als im Frühling. Außerdem stellen adulte Tiere oftmals ein qualitativ anderes Gift her als Jungtiere, letzteres ist häufig sogar aktiver [Tu 1982].

Das Gift der Schlange dient dem Beuteerwerb, der Verdauungshilfe und der Verteidigung. Schlangengifte greifen nicht nur in vitale Körperfunktionen des Beutetieres ein, mit dem Ziel, es wehrlos zu machen, sondern leiten darüber hinaus bereits die Verdauung ein. Schließlich verschlingt eine Schlange ihre Beute ja unzerkaut und in deren Gesamtheit. Daher werden hohe Ansprüche an das Gift gestellt, das bei einigen Arten tatsächlich aktiver als das Pankreassekret der Säuger ist [Elliott 1978; Mebis 1978; Lee 1979].

Frisches Schlangengift ist entweder farblos oder gelblich und hat eine wässrige, visköse Konsistenz. Will man dieses Naturprodukt über längere Zeit aufbewahren, so ist dies bei trockener und kühler Lagerung seines Pulvers, das man nach Vakuum- oder Gefriertrocknung gewinnt, jahrzehntelang ohne Aktivitätsverlust möglich [Ramsey u. Gennaro 1959; Russell et al. 1960; Mebis 1974].

Es gibt im Wesentlichen drei unterschiedliche Methoden, um Schlangengift zu gewinnen [Tu 1982]: Erstens; man provoziert die Schlange, in einen Auffangbehälter zu beißen und ihr Gift dort hinein zu injizieren. Die zweite Möglichkeit stellt eine Art Melkvorgang dar, indem man manuell einen leichten Druck auf die Giftdrüse ausübt. Und drittens kann man den die Drüse

umgebenden Muskel elektrisch stimulieren, worauf er sich kontrahiert und das Gift aus der Drüse presst.

Die Vergiftungssymptomatik wird durch die verschiedenen Komponenten eines Schlangengiftes bestimmt. Man unterscheidet hierbei Toxine, Enzyme und sonstige Bestandteile.

- **Toxine**

Toxine entfalten spezifische Reaktionen an Zellmembranen, Rezeptoren und Ionenkanälen. Man kann grob zwischen Neuro-, Kardio- und Zytotoxinen unterscheiden.

- Neurotoxine

Vor allem die Gifte von Elapiden enthalten Neurotoxine, die das periphere Nervensystem (die Blut-Hirn-Schranke überwinden die Toxine nicht) angreifen. Die Bezeichnung Neurotoxin subsumiert all diejenigen Polypeptide, die spezifisch an nervöse Strukturen, wie Membranen, Ionenkanäle oder Rezeptoren binden.

Unterschieden werden sollte hier zwischen Toxinen, die an der postsynaptischen und solchen, die an der präsynaptischen Membran angreifen.

- Postsynaptisch aktive Neurotoxine

Diese werden auch als  $\alpha$ -Neuro- oder Curare-ähnliche Toxine bezeichnet, da auch sie durch Blockade des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors die Erregungsfortleitung inhibieren. Ein Beispiel für ein solches Neurotoxin stellt  $\alpha$ -Bungarotoxin dar.

- Präsynaptisch aktive Neurotoxine

An der präsynaptischen Membran greifen einerseits neurotoxische Phospholipasen A<sub>2</sub> und andererseits Ionenkanal-blockierende Toxine an.

Phospholipasen A<sub>2</sub> besitzen in Schlangengiften nicht nur enzymatische, sondern auch toxische Eigenschaften [Mebs 1977b]: Wahrscheinlich binden sie spezifisch an einen Rezeptor in der Membran und hemmen auf im Detail noch ungeklärte Art und Weise die Freisetzung von Acetylcholin an der neuromuskulären Endplatte. Die einsetzende Lähmung der Muskulatur ist irreversibel, da die Synapse durch die Phospholipase A<sub>2</sub> letztlich enzymatisch zerstört wird. Auch Antiserum kann

diesen Prozess nicht stoppen. Man hat verschiedene Varianten der toxischen Phospholipase A<sub>2</sub> gefunden, die unterschiedliche Molekülstrukturen besitzen und folgende Bezeichnungen erhalten haben: Notexin im Gift von *Notechis scutatus* (die Phospholipase A<sub>2</sub> stellt eine durch sieben Disulfidbrücken stabilisierte Polypeptidkette dar), Taipoxin im Gift des australischen Taipans, *Oxyuranus scutellatus*, (ein Komplex aus strukturell homologen Enzymen) oder Crotoxin im Gift von *Crotalus durissus terrificus* (hier liegt die Phospholipase A<sub>2</sub> in einem Komplex mit einem Peptid vor [Rosenberg 1990; Hawgood u. Bon 1991; Kini 1997]. Crotoxin besteht zum Beispiel aus einer basischen Phospholipase A<sub>2</sub> und einem sauren Protein, dem man die Namen Crotoxin A oder Crotapotin gegeben hat. Crotapotin vermag die Toxizität der Phospholipase A<sub>2</sub> zu potenzieren und deren enzymatische Aktivität zu hemmen. Man nimmt an, dass Crotapotin erst dann vom gesamten Enzym abdissoziiert, nachdem es die Phospholipase A<sub>2</sub> an die motorische Endplatte geleitet und dort deren spezifische Bindung ermöglicht hat. Dann wird die Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität aufgehoben, so dass sie ihre toxische Wirkung an der Präsynapse entfalten kann [Breithaupt et al. 1974; Hendon u. Bieber 1982]. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Gift der Spezies *Crotalus atrox* hat keine Wirkung an der neuromuskulären Synapse; ein Crotoxin-artiges Toxin, also eine Phospholipase A<sub>2</sub>, die sowohl enzymatische als auch toxische Aktivität hat, konnte in diesem Gift nicht nachgewiesen werden [Gopalakrishnakone et al. 1981].

Dendrotoxin stellt ein Beispiel für ein präsynaptisch Ionenkanal-blockierendes Neurotoxin dar, es ist in Mamba-Giften enthalten. Es verstärkt die Transmitterfreisetzung, indem es Kalium-Kanäle blockiert [Dreyer 1990; Harvey et al. 1990; Cervenansky et al. 1991; Harvey 1993].

- Kardio- und Zytotoxine

Viele Elapiden-Gifte enthalten hochkonzentriert Kardio- und Zytotoxine, die eine Reihe von Membranveränderungen bewirken: Zell-Lyse in vitro, Depolarisation, Porenbildung, Aktivierung von endogenen Phospholipasen A [Dufton u. Hider 1991].

Wenngleich die beschriebenen Toxine nicht in jedem Schlangengift enthalten sind, so haben sie doch alle den Gehalt an Enzymen gemeinsam [Iwanga u. Suzuki 1979]. Allerdings können, wie oben bereits am Beispiel der Phospholipase A<sub>2</sub> erläutert wurde, auch Enzyme eine toxische Wirkung entfalten.

- **Enzyme**

Durch Hydrolyse spalten die in Schlangengiften enthaltenen Enzyme mindestens fünf verschiedene Bindungen:

- Glykosid-Bindung-spaltende Enzyme

Hyaluronidase kommt im Gift vieler Schlangen (so im Gift von *C. atrox*) vor und wird auch „spreading factor“ genannt [Duran-Reynals 1939]. Durch die Depolymerisation des Mukopolysaccharids Hyaluronsäure, wird die Kittsubstanz zwischen den Zellen und damit Haut und Gewebe durchdringbar. Der Gehalt eines Schlangengiftes an Hyaluronidase scheint die Ausmaße eines Ödems nach einer Bissverletzung mitzubestimmen [Russell 1967].

- Phosphorsäureester-spaltende Enzyme

5'-Nukleotidase ist eines der Phosphorsäureester-spaltenden Enzyme. Eine direkte Beteiligung an der Vergiftungssymptomatik wird eher nicht angenommen [Mebis 2000]. Die fast immer in Schlangengiften enthaltene Phosphodiesterase stellt eine Exonuklease dar, die 5'-Nukleotide vom 3'-Ende der Polynukleotide abspaltet.

- Carbonsäureester-spaltende Enzyme

Das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub>, das von allen Enzymen am häufigsten in Schlangengiften enthalten ist, spaltet Carbonsäureester-Bindungen, so dass aus einem hydrolysierten Phospholipid eine Fettsäure frei wird. Auf diese Weise entsteht aus Phosphatidylcholin (Lezithin) Lysophosphatidylcholin (Lysolezithin). Man bezeichnet das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> auch als Hämolyysin (Lyse von Erythrozyten in vitro), Myolysin oder Neurotoxin gemäß dessen Wirkung im Organismus. Auch Bienen, Skorpione oder Krustenechsen enthalten in ihren Giften Phospholipase A<sub>2</sub> [Mebis 2000].

Eine Lysophospholipase geht noch einen Schritt weiter und hydrolysiert Lysolezithin. Sie scheint in einigen Giften (so im Gift von *C. atrox*) enthalten zu sein und wird auch als Phospholipase B bezeichnet.

Auch Acetylcholinesterasen spalten Carbonsäureester. Ausschließlich einige Elapiden-Gifte weisen Acetylcholinesterase-Aktivität auf [Iwanga u. Suzuki 1979].

- Peptidbindungen-spaltende Enzyme

In Schlangengiften enthaltene Proteasen und Peptidasen sind meist Endopeptidasen und verdauen Gewebe-Proteine und -Peptide. Sie scheinen Familien-spezifisch zu sein, da sie zwar in Giften der Crotalidae, der Viperidae und der Colubridae, kaum jedoch in denen der Elapidae oder Hydrophiidae enthalten sind. Diese Verdauungsenzyme spalten native, nicht denaturierte Proteine. Sie greifen in die Blutgerinnung ein, wirken als Hämorrhagine, weil sie Kapillaren zerstören, oder als Kininogenasen und setzen Bradykinin frei.

So spalten thrombinähnliche Enzyme von Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B ab und leiten hierdurch die Polymerisation zu Fibrin ein. Ferner gibt es Enzyme, die die verschiedenen Faktoren der Blutgerinnung zu aktivieren vermögen. Während in vitro die Bildung von Fibringerinnseln Folge dieser enzymatischen Aktivitäten ist, wird in vivo das Vergiftungsgeschehen selten durch das Auftreten von Thrombosen bestimmt. Das körpereigene fibrinolytische System macht durch seine überschießende Reaktion auf die vermehrte Fibrinbildung das Blut sogar ungerinnbar: Durch den raschen Umsatz von Fibrinogen resultiert eine Verbrauchskoagulaopathie. Blutungen aus Wunden, Schleimhäuten oder inneren Organen komplizieren die Vergiftungssymptomatik und sind oft letal.

Allerdings konnte man einigen dieser Enzyme auch einen positiven Nutzen abgewinnen und behandelt damit erfolgreich Thrombosen [Furukawa u. Ishimura 1990; Kornalik 1991; Hutton u. Warrell 1993]. Ancrod ist ein thrombinähnliches fibrinogenspaltendes Enzym aus dem Gift der malayischen Grubenotter (*Calloselasma rhodostoma*). Es bildet lösliche Fibrinogenspaltprodukte, die nicht quervernetzt werden und gerinnungshemmend wirken. Zudem entsteht aus Prothrombin ein Zwischenprodukt, welches schlechter in Thrombin umgewandelt

werden kann. Ancrod setzt die Blutviskosität herab, verbessert damit die Rheologie und bewirkt die Auflösung von Fibringerinnseln. In den Jahren von 1993 bis 1998 wurden 500 Patienten mit akutem ischämischen Insult 72 Stunden lang mit Ancrod intravenös versus Placebo behandelt. Die STAT-Studie (stroke treatment with ancrod trial) zeigte ein besseres funktionelles Ergebnis, weniger multimorbide Patienten, allerdings keine Senkung der Mortalität und insgesamt ein günstiges Nutzen-Risiko-Profil unter Ancrod [Sherman et al. 2000]. Batroxobin, das auch mit Defibrase oder Reptilase bezeichnet wird, ist ein Gerinnungsenzym aus dem Gift von *Bothrops moojeni*. Es wird in der Blutgerinnungsforschung und -diagnostik verwendet. So weist die Reptilase-Zeit (Batroxobin-Zeit) als Heparin-unabhängige Alternative zur Thrombin-Zeit Störungen der Fibrinpolymerisation nach. Außerdem stabilisierte Batroxobin im Tierversuch atherosklerotische Plaques [Hunag et al. 2003].

Hämorrhagine sind Proteasen aus Vipern- und Klapperschlangen-Giften, die die Basalmembran hydrolysieren, so dass die Kapillaren für Erythrozyten durchlässig werden [Ownby 1990; Bjarnason u. Fox 1994]. Es handelt sich hierbei um Metalloproteasen, die ein zentralständiges Zink-Atom besitzen.

Bradykinin, das mittels Kallikrein (eine Kininogenase) aus Kininogen freigesetzt wird, wirkt im Organismus durch direkten Angriff an der glatten Muskulatur blutdrucksenkend [Iwanga u. Suzuki 1979; Schachter 1980; Mebs 1990] und lokal Schmerz-auslösend. Kininogenasen scheinen in allen Klapperschlangen-Giften enthalten zu sein; im Gift von *C. atrox* allerdings in nur geringer Aktivität [Rothschild u. Rothschild 1979]. Darüber hinaus sind in den Giften auch Enzyme enthalten, die Bradykinin hydrolysieren.

- L-Aminosäureoxidase

Das Enzym L-Aminosäureoxidase, das L-Aminosäuren zu  $\alpha$ -Ketosäuren oxidiert und damit die letzten Schritte des Proteinabbaus katalysiert, kommt in fast allen Schlangengiften vor. Die prosthetische Gruppe Flavinnukleotid verleiht den Schlangengiften ihre gelbe Farbe.

- **Sonstige Bestandteile von Schlangengiften**

Weitere nicht-enzymatische Bestandteile von Schlangengiften sind: Cholinesterase-Inhibitoren (Fasciculine) und Calcium-Kanal-Blocker (Calciseptin) in Mamba-Giften, sich gegenseitig in ihrer Toxizität potenzierende Polypeptide oder auch Opiatrezeptoren-Blocker [Bevan u. Hiestand 1983].

### ***1.3 Giftschlangenbisse***

Schlangenbisse stellen vor allem in den Tropen eine alltägliche Gefährdung dar. Allerdings sollten auch in Mitteleuropa Personen, die Kontakt mit Schlangen haben und einem entsprechenden Risiko ausgesetzt sind, die Verhaltensregeln im Ernstfall beherrschen. Denn eine akute Vergiftung durch einen Schlangenbiss ist zunächst einmal ein medizinischer Notfall.

Statistisches Zahlenmaterial, was Unfälle mit Giftschlangen betrifft, ist schwer zugänglich, beziehungsweise beruht es auf Schätzungen, die viele Autoren in ihrer Richtigkeit anzweifeln. So geht die WHO jährlich von weltweit 40 000 Todesfällen als Folge von Schlangenbissen aus [Swaroop u. Grab 1954]. Was die Anzahl der durch Giftschlangen-Bisse in den Vereinigten Staaten verletzten Personen anbelangt, so belaufen sich die Schätzungen auf 8 000 pro Jahr. Davon sterben circa 9 bis 14 Patienten, zumeist wegen zu spät begonnener Behandlung oder aufgrund von Komplikationen insbesondere bei Kindern oder älteren Patienten [Russell 1980a; Russell 1980b; Gomez u. Dart 1995]. Die entsprechenden Daten aus Mittel- und Südamerika müssen vorsichtig interpretiert werden: So gilt die Angabe, jährlich erlitten 11 von 100 000 Brasilianern einen Schlangenbiss und die Mortalitätsrate betrage 0,66 % unter Experten als zu niedrig [Raw et al. 1991; Fan u. Cardoso 1995; Gutierrez 1995].

Während in Deutschland vor allem importierte Tiere für Schlangenbisse verantwortlich sind [WHO 1981], werden in den USA Unfälle vornehmlich durch Klapperschlangen verursacht, in Mittel- und Südamerika hauptsächlich durch Lanzenottern.

Die Symptome eines Schlangenbiss beim Menschen variieren von Schlange zu Schlange und von Fall zu Fall. Im Allgemeinen können fünf Symptom-Komplexe unterschieden werden:

- **Neurotoxizität**

Die Gifte vieler Elapiden und Seeschlangen wirken in erster Linie neurotoxisch. Hier sei nur angemerkt, dass auch als Folge des Bisses von *Crotalus durissus terrificus* oder von *Crotalus scutulatus* Symptome wie Okulomotorius-, Fazialisparese, Ptosis und schließlich Atemlähmung beobachtet werden können. Ansonsten ist Neurotoxizität bei Klapperschlangen-Giften eher ungewöhnlich.

- **Myotoxizität**

Myotoxizität schreibt man den Schlangengiften mancher Seeschlangen und australischen Elapiden zu. Eine spezifische Phospholipase A<sub>2</sub> greift die quergestreifte Muskulatur direkt an und zerstört diese. Myoglobulinurie ist die Folge.

- **Störung der Blutgerinnung**

Die Gifte von Vipern oder Grubenottern sind dafür bekannt, dass sie zu einer Verlängerung der Blutgerinnungszeit des Opfers führen oder dessen Blut für Tage bis Wochen gar völlig ungerinnbar machen. Erste Anzeichen eines derartigen Geschehens sind unstillbare Schleimhautblutungen.

- **Hämorrhagie, Nekrose und Ödem**

Vipern und Grubenottern verursachen Hämorrhagien, Nekrosen und Ödeme um die Bisswunde [Ohsaka 1979]. Hämokonzentration und Schock sind Folgen der oftmals massiven Ödembildung. Darüber hinaus können diese Ödeme Ursache eines in seltenen Fällen auftretenden Kompartmentsyndroms sein.

- **Herz-, Kreislaufbeschwerden**

Herz-, Kreislaufbeschwerden beruhen wohl in erster Linie auf Elektrolytverschiebungen, wie sie zum Beispiel von Elapiden-Giften verursacht werden. Desweiteren wird eine direkte Wirkung möglicher kardiotoxischer Proteine diskutiert.

Eine Klapperschlange beißt ein oder mehrere Male zu, so dass als Zeichen eines erfolgten Bisses mindestens eine punktförmige Wunde zu finden ist, mitunter finden sich zwei oder auch mehrere Bissmarken. Bei einem Verteidigungsbiss wird, im Gegensatz zum Beutebiss, häufig kein Gift injiziert; 20 bis 50 % verlaufen „trocken“ [Reid 1972; Mebs 1987].

Unmittelbar nach dem Biss einer Viper kommt es zu einem Blutdruckabfall. Die anschließend lang anhaltende Phase der Hypotonie wird wahrscheinlich durch körpereigene Plasmafaktoren wie zum Beispiel Bradykinin verursacht, die durch das Gift freigesetzt werden. Ferner besteht auch die Möglichkeit einer allergischen Reaktion des Opfers auf das Fremdeiweiß des Schlangengiftes.

Charakteristisch für eine Vergiftung durch den Biss einer Grubenotter ist ein sich rasch (innerhalb von 10 bis 20 Minuten) um die Bissstelle entwickelndes Ödem, das von starken Schmerzen begleitet ist. Während sich das Ödem kontinuierlich ausbreitet, treten weitere Symptome auf: Blässe, Herzklopfen, Übelkeit und Erbrechen. Die regionalen Lymphknoten sind in der Regel druckschmerzhaft. Innerhalb weniger Stunden bilden sich auf der erythematös bis ekchymotischen Haut Blasen, die sich anschließend mit Blut füllen bevor sie Tage später aufplatzen. Hieraus resultieren mitunter ausgedehnte Gewebnekrosen, die sich sekundär infizieren können.

Insbesondere als Folge von Bissverletzungen durch Lanzenottern tritt eine Verbrauchskoagulopathie auf: Das Blut des Patienten ist frei von Fibrinogen und reich an Fibrinogen-Spaltprodukten als Zeichen eines aktivierten fibrinolytischen Systems. Klinisch sind in diesem Zusammenhang Blutungen aus Wunden, Zahnfleischbluten oder Epistaxis zu beobachten. Kommt es zu inneren Blutungen, besteht die Gefahr eines hämorrhagischen Schocks, der wiederum den ödematös bedingten hypovolämischen Schockzustand verschlimmert. Selbst intrazerebrale Blutungen wurden beschrieben [Mosquera et al. 2003].

Das periphere Nervensystem bleibt von Viperiden-Giften weitgehend verschont. Akutes Nierenversagen tritt auf als Folge von massiv reduziertem renalen Blutfluss, Myoglobinurie oder obstruierter ableitender Harnwege [Tu 1982].

#### ***1.4 Behandlung von Giftschlangenbissen***

Für medizinisch geschultes Personal wie Laien gelten einige grundlegende Regeln, was die Erstbehandlung von Giftschlangenbissen anbetrifft:

Oberste Priorität hat dabei der zügige und sichere Transport des Patienten in das nächste Krankenhaus. Betroffene (und gegebenenfalls Begleitpersonen) müssen beruhigt werden. Denn nur so können rationale Entscheidungen getroffen, eine mögliche Vergiftungssymptomatik deutlich ausgemacht und von psychogenen Reaktionen klar unterschieden werden. Das betroffene Körperteil soll nach Möglichkeit ruhig gestellt werden: Ein Arm sollte beispielsweise in einer Schlinge getragen, ein verletztes Bein geschient werden. Wenn möglich sollte der Transport im Liegen erfolgen. All dies dient der Vermeidung von überflüssiger Muskelkontraktion, die der rascheren Ausbreitung des Giftes über die Lymphgefäße förderlich wäre. Schmuck oder Kleidung, die aufgrund eines sich ausbreitenden Ödems schnell zu Schnürringen werden können, müssen sofort von der betroffenen Extremität entfernt werden. Nur wenn ärztliche Hilfe in den nächsten Stunden nicht zu erwarten ist, sollte dem Betroffenen Wasser zum Flüssigkeitsersatz angeboten werden, nicht jedoch Kaffee oder gar Alkohol. Treten Symptome eines Kreislaufkollaps oder einer Ateminsuffizienz auf, muss das Opfer in die Schocklage gebracht und gegebenenfalls beatmet werden.

Wenn Bissmarken auch nicht immer deutlich zu sehen sind, so weist doch eine bald einsetzende lokale Schwellung im Anschluss an den Biss einer Grubenotter relativ sicher auf eine beginnende Vergiftung hin. Unspezifische Zeichen, wie Blässe, Schweißausbrüche und Erbrechen sind häufig psychischer Natur (die Verabreichung von Benzodiazepinen kann bei besonders agitierten Patienten unter Umständen indiziert sein).

Um eine Vergiftung zu diagnostizieren und die verantwortliche Schlangenart zu bestimmen, steht in Australien ein „Venom Detection Kit“ zur Verfügung [Mebs 2000]. Der immunologische Nachweis von Giftantigenen aus Körperflüssigkeiten gelingt allerdings nur für die dort anzutreffenden Schlangenspezies.

Die Identifikation der Giftschlange ist vor allem in den Gebieten notwendig, in denen unterschiedliche Arten (Vipern wie Elapiden) vorkommen, so dass bei

Bedarf das entsprechende Antiserum eingesetzt werden kann. Bei dem Versuch, die Schlange zwecks Bestimmung zu töten oder einzufangen, ist selbstverständlich äußerste Vorsicht geboten.

Häufig werden betroffene Extremitäten von Ersthelfern abgebunden. Die Ausbreitung des Giftes kann dadurch nicht verhindert werden, zumal sich diese zum Großteil entlang der Faszien und in den tieferliegenden Geweben abspielt [Mebis 1983]. Meist wird eine Staubinde zu fest und über einen zu langen Zeitraum angebracht. Unterbrochene Blutzirkulation und in ihrer Ausdehnung potenzierte Ödeme und Nekrosen (vor allem bei Crotaliden-Bissen) können derart schwerwiegend sein, dass anschließend amputiert werden muss. Außerdem wurde bereits von Schock und Herzstillstand beim Lösen der Staubinde durch die plötzlich in den Kreislauf eintretende hohe Giftkonzentration berichtet [McCollough u. Gennaro 1963; Laravuso 1980]. Da das Gift sehr schnell ins Gewebe diffundiert, ist auch das Aussagen der Bissstelle zwecklos.

In Australien, wo Unfälle ausschließlich durch Elapiden verursacht werden, rät man, die jeweilige Extremität von der Verletzung ausgehend zu bandagieren. Mit dieser „pressure immobilization technique“, so wird berichtet, könne die Ausbreitung des Giftes über die oberflächlichen Lymphbahnen und Kapillaren in den großen Kreislauf teilweise verzögert werden [Winkel et al. 1999; Gray 2003]. Allerdings ist dieses Vorgehen ungeeignet, sofern es sich um den Biss einer Grubenotter handelt. Diese Gifte provozieren derart ausgedehnte Ödeme, dass eine Bandage den Druck auf das Gewebe gefährlich verstärken würde.

Außerdem wird oft propagiert, die Wunde durch Inzisionen zu vergrößern (so könne das Gift abfließen) oder die Bissstelle komplett auszuschneiden. Sehnen, Nerven oder Gefäße können hierbei verletzt oder Infektionen provoziert werden. Bissmarken werden mitunter in ausgedehnte Wunden umgewandelt, die potentielle Blutungsquellen darstellen, sollte es zu einer Blutgerinnungsstörung kommen [Mebis 1983].

Von einer Kryotherapie ist ebenfalls abzuraten. Die intensive Kühlung der jeweiligen Extremität mit Eis resultiert meist in Erfrierungen und massiven Nekrosen [McCollough u. Gennaro 1963; Russell 1980a].

Leider wird der Ersthelfer zu diesen bewiesenermaßen gefährlichen Maßnahmen regelrecht ermutigt. Man verweist auf eben diese nicht nur in der Literatur; es gibt zu diesen Zwecken sogar speziell angefertigte Apparate im Handel: besondere (unsterile) Nadeln, Nägel oder Schießvorrichtungen, die kleine Messerchen in die Bissstelle einstecken sollen [Mebis 2000]. Ein tatsächlicher Nutzen jedwelcher Art konnte bisher nicht dokumentiert werden [Reitz et al. 1984].

Es wurde sogar eine Elektroschockbehandlung (25 kV; 1 mA) zur Behandlung von Bissverletzungen angepriesen [Guderian et al. 1986]. Vor dieser Art der Erstbehandlung beziehungsweise vor der Anwendung der „stun gun“, die Stromschläge in die Bissstelle appliziert, wird jedoch dringend gewarnt [Mebis 1987; Bucknall 1991].

Nach wie vor empfiehlt fast jedes Volk seine ganz besonderen Hausmittel, um den Betroffenen von seiner Vergiftung zu kurieren: Kaliumpermanganat zum Einreiben oder Trypsin intravenös [Hsiung et al. 1975; Broad et al. 1980; Huang u. Lee 1980]. Die Vorschläge sind mannigfaltig, jedoch durchweg als wirkungslos und oft sogar gefährlich einzustufen.

In der Klinik sollten Blutentnahmen (klinische Chemie, Blutbild und Gerinnung) und bei fehlendem oder unklarem Impfschutz eine Tetanus-Prophylaxe gemacht werden. Eine Verlängerung der Gerinnungszeit ist schon 10 bis 20 Minuten im Anschluss an einen Biss durch *Bothrops*-Arten festzustellen [Mebis 2000]. Die Kontrolle des Hämatokrit-Wertes und der Elektrolyte dient der frühzeitigen Erkennung eines Schockgeschehens. Diese Gefahr besteht in erster Linie bei einer Vergiftung durch Grubenottern-Gifte, die zu ausgeprägten Ödemen und darüber hinaus zu Blutungen führen können. Gibt es keinerlei Anzeichen einer Vergiftung, so sollte der Patient zwölf weitere Stunden lang überwacht werden.

Die Applikation von Antiserum stellt eine spezifische Therapie bei Giftschlangenbissen dar. Keinesfalls darf Antiserum vom Ersthelfer, sondern nur von einem Arzt, der über die nötigen intensivmedizinischen Möglichkeiten verfügt, gegeben werden. Wurde der Patient in der Vergangenheit schon einmal einer Serumtherapie unterzogen, so ist er möglicherweise gegen Fremdproteine sensibilisiert, was bei erneutem Kontakt zu Anaphylaxie führen kann [Heard et al.

1999]. Außerdem wird, wenn zum Beispiel mehr als 50 bis 80 ml Antiserum verabreicht wurden, nach acht bis zehn Tagen eine sogenannte Serumkrankheit beobachtet [Mebs 2000]. Diese Immunkomplexreaktion (Typ III der Überempfindlichkeitsreaktionen) tritt vor allem nach intravenöser Gabe hoher Antigen-Dosen auf und führt zu entzündlichen Gewebeschäden durch Ablagerung der Komplexe und Komplementaktivierung. Treten erste Symptome wie Urtikaria, Ödeme, Arthralgien oder Lymphknotenschwellungen auf, so können diese mit Kortikosteroiden behandelt werden [Wingert u. Chan 1988].

Ist infolge des Bisses einer Grubenotter eine systemische Vergiftung sicher bewiesen (Schwellung um die Bissstelle, Blutungen aus Wunden und Schleimhäuten), so muss hochdosiert mit Antiserum behandelt werden. Derzeit ist in den USA nur ein Antiserum zur Behandlung von Bissverletzungen durch Crotalidae (Grubenottern) erhältlich: Antivenin (Crotalidae) Polyvalent (ACP) [Dart u. McNally 2001]. Es gibt keine prospektiven Daten bezüglich der Wirksamkeit dieses Medikaments. In prospektiven Studien wird derzeit ein neues Produkt, CroFab; FabAV, getestet. Es ist ein Fab (fragment antigen binding) - Antiserum, das spezifisch gegen in den USA einheimische Schlangenspezies gerichtet ist, und scheint ebenso effektiv wie IgG-Antiseren zu sein [Dart et al. 2001]. Allerdings haben Fab-Moleküle eine kürzere Halbwertszeit, so dass die Gefahr besteht, dass unter Therapie bereits abgeklungene Symptome wie Koagulopathie nach einer bestimmten Zeit wieder auftreten. Fab-Antiserum muss mindestens 18 Stunden lang wiederholt intravenös appliziert werden [Boyer 2001]. Anaphylaktische Reaktionen und Serumkrankheit wurden bisher seltener als unter IgG-Antiserum-Therapie beobachtet. Außerdem gehen Fab-Fragmente sehr schnell in Lösung, gelangen also rasch an ihren Wirkort, und sind extrem stabil gegen Hitze, was deren Lagerung und Transport vereinfacht.

In Südamerika sollte auf die dort hergestellten Präparate zurückgegriffen werden: zum Beispiel AVIB (antivenom Instituto Butantan) gegen *Bothrops*-Arten und polyvalentes AVCP (antivenom Instituto Clodomiro Picado). Hierbei neutralisiert 1 ml AVCP 2,5 ml *Bothrops asper*-Gift [Picolo et al. 2002].

Die symptomatische Behandlung einer Giftschlangenbiss-Verletzung ist oftmals nicht nur begleitende, sondern einzige mögliche Therapie. Mit Hilfe von Infusionen wird die Gefahr eines hypovolämischen Schocks abgewendet. Die Intubation und Beatmung des Patienten ist nötig, wenn es zu einer Lähmung der Atemmuskulatur durch ein neurotoxisches Gift kommt. Bei renaler Beteiligung ist eine Hämodialyse durchzuführen. Als wenig wirksam erwiesen sich Kortikosteroide, Gerinnungsfaktoren, Thrombozytenkonzentrate oder Heparin [Mebis 2000].

Nur ausnahmsweise kommt es infolge eines Schlangenbisses zu einem Kompartmentsyndrom. Trotzdem wird oft angesichts eines Ödems von beeindruckendem Ausmaß eine Fasziotomie vorgenommen. Letztere sollte nur dann durchgeführt werden, wenn ein Kompartmentsyndrom auch tatsächlich sonographisch, durch Druckmessung in den Logen oder klinisch anhand von Paresen oder Pulslosigkeit nachgewiesen wurde.

Nekrosen sollten erst nach Tagen chirurgisch abgetragen werden, denn vielfach ist dem Anschein nach abgestorbenes Gewebe letzten Endes noch vital und kann gerettet werden. Zu schnelles, rigides Vorgehen [Glass 1969] ist oft folgenschwer für den Patienten. Hauttransplantationen, Lappenplastiken oder Amputationen sollten den schweren Fällen als ultimo ratio vorbehalten bleiben.

### ***1.5 Problemstellung***

Im Rahmen dieser Arbeit sollte am Beispiel von 36 verschiedenen Giftproben zweier Giftschlangen-Arten, *Crotalus atrox* (amerikanische Klapperschlange) und *Bothrops asper* (südamerikanische Lanzenotter), die unterschiedliche Zusammensetzung von Schlangengiften untersucht werden. Hierzu wurden die Aktivitäten acht verschiedener Enzyme in den Rohgiften bestimmt. Darüber hinaus wurden die Proben von *Bothrops asper* chromatographisch aufgetrennt und die proteolytische Aktivität der einzelnen Fraktionen sowie deren Fähigkeit, Humanplasma zu koagulieren bestimmt.

Auf diese Weise sollte ersichtlich werden, ob die Gifte dieser Schlangen in erster Näherung als gleich oder ähnlich bezeichnet werden dürfen. Daraus sollte abgeleitet werden, ob die standardisierte Behandlung entsprechender Bissverletzungen gerechtfertigt ist und welches Gift beziehungsweise welche Fraktion sich für die Gewinnung bestimmter Enzyme zu Forschungszwecken besonders gut eignen könnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Schlangengifte

Von den insgesamt 36 untersuchten Rohgiften stammten 16 von *Bothrops asper* und 20 von *Crotalus atrox*. Die Herkunft der Gifte ist in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt. In Tabelle 1 sind die Gifte von *Bothrops asper* aufgetragen, die in ihrem Kürzel den Buchstaben „B“ enthalten und fortlaufend durchnummeriert sind. Bei den Giften von *Crotalus atrox*, die in Tabelle 2 aufgeführt sind, enthält die interne Bezeichnung jeweils ein „C“.

#### 2.1.1 *Bothrops asper*

Bei den Lanzenottern, deren Gift hier als Probe diente, handelte es sich um neun Männchen und acht Weibchen. Die Körperlänge der Schlangen lag zwischen 83 und 167 cm. Alle Schlangen wurden in Ecuador gefangen und ihr Gift vor Ort von Antonio Freire und Ulrich Kuch entnommen. Hierbei entleerten die Schlangen ihr Gift jeweils unter leichtem Druck auf die Giftdrüse in eine Petrischale. Dies erfolgte für alle hier analysierten Proben im August 1999. Im Anschluss daran wurden die Gifte bei Raumtemperatur und über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet. Das Alter der Schlangen ist nicht bekannt, es handelte sich jedoch um adulte Tiere.

Interne Bezeichnung	Geschlecht	Länge [cm]	Fundort
B01	Männchen	132	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador
B02	Weibchen	83	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador
B03	Weibchen	97	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador
B04	Weibchen	141	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador

B05	Männchen	102	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador
B06	Männchen	99	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador
B07	Weibchen	127	San Borondon; Provinz Guayas; Ecuador
B08	Männchen	117	Balzar; 8 km in Richtung Empalme; Provinz Los Rios; Ecuador
B09	Weibchen	167	Balzar; 8 km in Richtung Empalme; Provinz Los Rios; Ecuador
B10	Weibchen	126	Vinces; Provinz Los Rios; Ecuador
B11	Weibchen	130	Vinces; Provinz Los Rios; Ecuador
B12	Männchen	113	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador
B13	Weibchen	134	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador
B14	Männchen	125	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador
B15	Weibchen	133	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador
B16	Männchen	140	Hacienda El Rencor; Kanton Cumanda; Provinz Chimborazo; Ecuador

**Tabelle 1: Schlangen der Spezies *Bothrops asper* und deren Gifte**

### 2.1.2 *Crotalus atrox*

Bei den Klapperschlangen handelte es sich mit einer Ausnahme um weibliche Individuen. Die Schlangen waren zwischen 70,1 und 99,5 cm lang. Die Tiere waren von Emily Taylor und Professor Dayle de Nardo, Department of Biology, Arizona State University, Tempe, Arizona gefangen worden. Das Gift der Tiere wurde in der zweiten August-Hälfte 2000 direkt vom Fangzahn, unter leichtem Druck auf die Giftdrüse, mit einem Eppendorf-Cup aufgefangen. Getrocknet wurden die Gifte analog dem oben geschilderten Verfahren bei Raumtemperatur über CaCl<sub>2</sub>.

Interne Bezeichnung	Geschlecht	Länge [cm]	Herkunft
C01	Weibchen	82,5	nahe Owlhead Buttes field site; Pinal Co.; Arizona; USA
C02	Weibchen	75,0	nahe Owlhead Buttes field site; Pinal Co.; Arizona; USA
C03	Weibchen	80,5	nahe Owlhead Buttes field site; Pinal Co.; Arizona; USA
C04	Weibchen	93,0	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C05	Weibchen	76,0	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C06	Weibchen	83,0	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C07	Weibchen	85,0	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C08	Weibchen	83,9	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C09	Weibchen	75,5	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA

C10	Weibchen	75,0	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C11	Weibchen	?	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C12	Weibchen	?	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C13	Männchen	90,5	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C14	Weibchen	82,5	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C15	Weibchen	72,0	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C16	Weibchen	83,0	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C17	Weibchen	81,0	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C18	Weibchen	70,1	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C19	Weibchen	75,0	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA
C20	Weibchen	75,0	Owlhead Buttes field site; Pinal Co. Arizona; USA

**Tabelle 2: Schlangen der Spezies *Crotalus atrox* und deren Gifte**

## ***2.2 Geräte und Chemikalien***

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die Extinktionsmessungen an einem Photometer des Typus Uvikon 860 der Firma Tegimenta durchgeführt. Hierzu wurden Quarzglas-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

Brutschrank und Zentrifuge (1,0R Megafuge): Heraeus; Hanau.

Die HPLC-Anlage stammte von MERCK und HITACHI (L-4000 UV-Detektor und L-6200A Intelligent Pump) und war mit einer Resource Q-Säule von Pharmacia Biotech; Uppsala ausgestattet.

Zur Bestimmung der Humanplasma-Koagulase wurden handelsübliche Citrat-Kanülen eingesetzt: 3 ml S-Monovette mit je 0,3 ml Citrat-Lösung von Sarstedt; Nümbrecht.

Von der Firma Serva; Heidelberg wurden bezogen: BAEE (N-Benzoyl-L-arginin-ethylester), o-Dianisidin und Meerrettich-Peroxidase (Enzyme Commission-Nummer 1-11-1-7).

Hersteller der folgenden benutzten Chemikalien war die Firma MERCK; Darmstadt: Salzsäure, Casein nach Hammersten, Triethanolamin und Trichloressigsäure. Rinderplasma-Fibrinogen (EC-Nummer 232-598-6), Hide-Powder-Azure, L-Leucin (EC-Nummer 200-522-0) und Bis[4-nitrophenyl]-phosphat-Natriumsalz wurden von Sigma, St.Louis, USA, bezogen.

## 2.3 Enzymbestimmungen

### 2.3.1 Argininester-Hydrolase-Aktivität

Als Substrat wurde in diesem Versuch ein synthetischer Aminosäureester verwendet: N-Benzoyl-L-arginin-ethylester, kurz BAEE genannt. Das Spaltprodukt Benzoylarginin, das durch die Zugabe von Schlangengift entsteht, verursacht eine Extinktionszunahme [Schwert u. Takenaka 1955].

1 ml BAEE-Lösung in einer Konzentration von 0,45 mg/ml, 2 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) und 0,1 ml Gift-Lösung in einer Konzentration von 0,5 mg/ml (in 0,9 %-iger Kochsalzlösung) wurden gemischt und die Extinktion im Abstand von 30 Sekunden sechsmal bei 253 nm gemessen.

Als Enzymeinheit wurde die Enzymmenge definiert, die in einer Minute 1  $\mu$ mol BAEE hydrolysiert.

$$\frac{U}{mg} = 3 \cdot \frac{\Delta E}{min} \cdot 20$$

wobei der Extinktionskoeffizient bei 253 nm und 25 °C mit 3 angenommen wurde, der Verdünnungsfaktor mit 20.

### 2.3.2 Casein-Hydrolyse-Aktivität

Casein ist ein Phosphoprotein, das den Hauptbestandteil der Milch ausmacht. Peptide und Aminosäuren, die durch proteolytische Spaltung von Casein freigesetzt werden, können mittels photometrischer Messung bei 280 nm quantitativ bestimmt werden [Kunitz 1947]. Das Prinzip des Versuchs bestand nun darin, die Extinktionszunahme der Probe (nämlich der mit Schlangengift inkubierten Casein-Lösung) gegenüber einer Kontrolle (keine Inkubation) zu messen.

Hierfür wurden 0,4 ml einer 1 %-igen Casein-Lösung zusammen mit 0,3 ml Tris-HCl-Puffer (0,1 M; pH 8,5) und 0,1 ml der Gift-Lösung (Konzentration 0,5 mg/ml 0,9 %-ige Kochsalzlösung) bei 37 °C 20 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,2 ml 5 %-iger Trichloressigsäure gestoppt, das gelöste Protein ausgefällt und bei 3000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde im

Photometer bei 280 nm gemessen, jeweils dreimal pro Ansatz gegen eine Kontroll-Lösung. Diese enthielt, wie die Probe auch, Casein-, Puffer- und Gift-Lösung in den gleichen Konzentrationen; allerdings wurde die Reaktion durch sofortige Zugabe von Trichloressigsäure unterbrochen. So wurde der „Nullwert“; die Extinktion der unveränderten Lösung bestimmt.

Eine Enzymeinheit wurde als die Enzymmenge definiert, die in 20 Minuten eine Extinktionszunahme von 0,001 verursacht.

### 2.3.3 Hide-Powder-Azure-Aktivität

Dieses Experiment diente, ähnlich dem Versuch mit Casein, der Bestimmung der proteolytischen Aktivität von Schlangengiften. Als Substrat diente Hide-Powder-Azure. Es handelt sich hierbei um eiweißreiche Extrakte aus Rinderhaut. Ein kovalent gebundener blauer Farbstoff kann von Schlangengift proteolytisch freigesetzt werden und ist für eine im Photometer messbare Extinktionszunahme der Probe gegenüber einer Kontrolle maßgeblich.

Hierzu wurden je Ansatz 4 mg Hide-Powder-Azure zu 1,05 ml Tris-Puffer (pH 8,5) gegeben und anschließend mit 0,05 ml Gift-Lösung in einer Konzentration von 1 mg/ml versetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde abzentrifugiert (5 Minuten; 5000 U/min) und die Extinktion des Überstandes bei 595 nm bestimmt. Als Kontrolle wurde die Hide-Powder-Lösung, die zwar einer zweistündigen Inkubation unterzogen aber nicht mit Gift versetzt worden war, benutzt. Die Differenz aus Probe und Kontrolle multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 20 gab die proteolytische Potenz des Giftes an. Um diese zahlenmäßig korrekt angeben zu können, sollte die folgende Definition gelten: Eine Enzymeinheit entspricht der Enzymmenge, die in zwei Stunden eine Extinktionszunahme um 0,01 gegenüber der Kontrolle bewirkt.

#### 2.3.4 Fibrinogen-Koagulase-Aktivität

Es wurden 0,1 ml Gift- zu 0,2 ml Fibrinogenlösung gegeben. Bei dem Substrat handelte es sich um Fibrinogen aus Rinderplasma, das in NaCl-Lösung 0,2-prozentig enthalten war. Die Konzentration des Giftes in Kochsalzlösung betrug 1 mg/ml. Die Lösung wurde anschließend bei 37 °C in einem Reagenzglas leicht hin und her bewegt und die Zeit bis zur Bildung eines Gerinnsels gestoppt. Für die Berechnung der Enzymeinheit galt: 1 U entspricht der Enzymmenge, die nötig ist, um nach einer Minute ein Koagel zu bilden [Mebis 1970].

#### 2.3.5 Humanplasma-Koagulase-Aktivität

Zur Bestimmung der Humanplasma-Koagulase-Aktivität wurden 0,2 ml verdünntes (1:3 mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung) menschliches Citrat-Plasma mit 0,1 ml Gift-Lösung versetzt. Je nach Schlangengiftart wurde mit verschiedenen Konzentrationen gearbeitet: Für *Bothrops asper* konnten bei einer Konzentration von 0,005 mg Gift pro 0,1 ml Kochsalzlösung die besten (das heißt messbare und konzentrationsabhängige) Ergebnisse erzielt werden, für *Crotalus atrox* bei 1 mg /ml. Plasma wurde zusammen mit dem Gift in ein Reagenzglas gegeben und unter leichtem Bewegen bei 37 °C die Zeit bis zum Auftreten eines Koagels gemessen. Wie bei der Bestimmung der Fibrinogen-Koagulase-Aktivität galt, dass eine Enzymeinheit die Menge an Enzym beschreibt, die in einer Minute ein Gerinnsel zu bilden vermag.

#### 2.3.6 L-Aminosäureoxidase-Aktivität

Das im Gift enthaltene Enzym L-Aminosäureoxidase katalysiert die Reaktion von L-Leucin zur 2-Ketoisocaproinsäure und Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid oxidiert seinerseits o-Dianisidin zu einem braunen Farbstoff. Das Produkt der zuletzt genannten Reaktion hat eine größere Extinktion als das Substrat im Versuchsansatz; die Extinktionszunahme ist hierbei der enzymatischen Aktivität des jeweiligen Schlangengiftes proportional [Böhringer 1973].

3 ml Puffer-Substrat-Lösung (bestehend aus: 50 mg L-Leucin, 50 ml Triethanolaminpuffer [0,2 M; pH 7,6] und 0,5 ml o-Dianisidin-Lösung [13 mg o-Dianisidin ad 2 ml destilliertes Wasser]) wurden mit 0,01 ml Peroxidase-Lösung

[10 mg Meerrettich-Peroxidase ad 1 ml Puffer] und 0,1 ml Gift-Lösung (0,5 mg Gift pro 1 ml 0,9 %-ige NaCl-Lösung) inkubiert. Bei 436 nm wurden anschließend sechs Messungen pro Ansatz im Abstand von je 30 Sekunden durchgeführt.

Für die Berechnung der Enzymeinheit galt:

$$\frac{U}{mg} = 3,1 ml \cdot \frac{\Delta E}{min} \cdot \frac{1}{8,1} \cdot 1 cm \cdot 0,1 ml$$

wobei:

Gesamtvolumen der Probe: 3,11 ml

Extinktionskoeffizient bei 436 nm und 25 °C: 8,1

Schichtdicke: 1 cm

Giftvolumen: 0,1 ml

### 2.3.7 Phosphodiesterase-Aktivität

Phosphodiesterasen spalten Phosphodiesterbindungen, wie sie zum Beispiel in Nukleinsäuren vorkommen. Im Versuch wurde als Substrat Bis-p-nitrophenylphosphat verwendet. Das Produkt der Reaktion p-Nitrophenol bewirkt eine Extinktionszunahme bei 405 nm [Razzell u. Khorana 1959].

1,5 ml Puffer-Substrat-Lösung (100 mg Bis[4-nitrophenyl]phosphat-Natriumsalz in 30 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer [pH 8,9]) und 0,1 ml Gift-Lösung der Konzentration 0,5 mg/ml wurden 60 Sekunden inkubiert und die Extinktion bei 405 nm im Abstand von 30 Sekunden sechsmal gemessen.

Für die Berechnung der Enzymeinheit galt:

$$\frac{U}{mg} = 1,6 ml \cdot \frac{\Delta E}{min} \cdot \frac{1}{18,5} \cdot 1 cm \cdot 0,1 ml$$

wobei: Gesamtvolumen der Probe: 1,6 ml

Extinktionskoeffizient bei 405 nm und 25 °C: 18,5

Schichtdicke: 1 cm

Giftvolumen: 0,1 ml

### 2.3.8 Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität

Schlangengifte enthalten das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub>, das von Phospholipiden eine ungesättigte Fettsäure abspaltet. Es entsteht ein Lysophospholipid. Als Substrat wurde eine Eigelb-Suspension verwendet, die Lecithin enthält. Letzteres wird zu Lysolecithin gespalten, was zu Klärung der Eigelb-Suspension führt [Marinetti 1965].

Hühnereigelb wurde mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung derart verdünnt, dass die Extinktion der Suspension bei 925 nm im Bereich zwischen 0,67 und 0,78 lag. 5 ml hiervon wurden mit 0,1 ml Gift-Lösung in einer Konzentration von 0,5 mg/ml versetzt, für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Extinktion bei 925 nm gemessen und mit dem Ausgangswert (Hühnereigelb-Suspension ohne Zugabe von Gift) verglichen. Definitionsgemäß entsprach eine Enzymeinheit der Enzymmenge, die in zehn Minuten eine Extinktionsabnahme von 0,001 bewirkte.

### 2.3.9 Fraktionierung der Gifte von *Bothrops asper*

Im Rahmen dieses Versuches wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie mit Hilfe einer Resource Q-Säule durchgeführt. Die Gift-Lösung (je 0,1 ml der Konzentration 4 mg/0,120 ml) wurde über einen Injektionsport auf die Säule aufgetragen. An den positiv geladenen Oberflächenstrukturen banden die negativ geladenen Proteine aus der Probe. Im Anschluss wurden die Proteine gemäß ihrem isoelektrischen Punkt von ihren Bindungsstellen an der stationären Phase verdrängt und mit der mobilen Phase aus der Säule eluiert. Hierbei bestimmte der kontinuierlich über 45 Minuten ansteigende Kochsalz-Gradient zu welchem Zeitpunkt welches Protein von der stationären in die mobile Phase wechselte. Proteine mit ähnlichen chemischen Eigenschaften konnten in einer Fraktion gesammelt und auf ihre Aktivität untersucht werden.

Der nötige Elutionsgradient wurde aus einem 0,05 M Tris-Puffer und einer zweiten Lösung bestehend aus 0,05 mol/l Tris und 0,5 mol/l NaCl (beide Lösungen: pH 8,5) aufgebaut. Die Elution des Protein-Gemisches von der Säule wurde bei 280 nm kontinuierlich gemessen und mittels eines Schreibers dokumentiert, so dass die Auftrennung eines Giftes in verschiedene Fraktionen anhand seines Elutionsdiagramms abgelesen werden konnte. Eine Fraktion

entsprach hierbei dem Kurven-Verlauf von einem Sattelpunkt über ein Maximum (ein sogenannter „Peak“) zu einem nächsten Sattelpunkt. Anschließend wurden die Fraktionen jeweils auf ihre Fähigkeit zur Proteolyse und Blutgerinnung geprüft (Hydrolyse von Casein und Koagulation von Humanplasma).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Rohgifte

Alle in dieser Arbeit untersuchten Gifte von *Bothrops asper* zeigten bei jedem der Enzyme Aktivität. Im Gegensatz hierzu reagierten die Proben von *Crotalus atrox* nicht immer: Bei den meisten Giften waren weder Fibrinogen- noch Humanplasma-Koagulase-Aktivität zu verzeichnen. Außerdem fielen bei der Bestimmung des Enzyms L-Aminosäureoxidase drei Gifte als inaktiv auf. Die hier dargelegten Ergebnisse für die Enzymbestimmungen der Rohgifte wurden jeweils anhand einer Abbildung, die alle Aktivitäten im Einzelnen aufzeigt, veranschaulicht (s. Abbildungen 1 bis 8). Außerdem wurden die Werte für die Gifte von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox* in den Tabellen 3 und 4 erfasst. Um einen grob orientierenden Überblick über die Gesamtheit der ermittelten Enzymaktivitäten zu erhalten, wurden die Ergebnisse in den Tabellen 5 und 6 schließlich semiquantitativ betrachtet. Das heißt, jeder Enzymaktivität wurde das Prädikat „nicht“, „gering“, „mäßig“ oder „sehr aktiv“ zugeordnet, so dass die Gifte untereinander leichter verglichen werden können.

### 3.1.1 Argininester-Hydrolase

Die größte Aktivität wies das Gift C02 von *Crotalus atrox* auf (3,2 U/mg). Als ebenfalls sehr aktiv fielen die Gifte C19 (2,8 U/mg), B03 (2,7 U/mg), C10 (2,6 U/mg) und C09 (2,6 U/mg) auf. Die geringste Enzym-Aktivität wurde für das Gift B13 gemessen: 0,8 U/mg (s. Abbildung 1).

Der Mittelwert aus allen Werten betrug 1,8 U/mg mit einer Standardabweichung von 0,6 U/mg, wobei der Mittelwert für alle *Bothrops* bei 1,6 (Standardabweichung: 0,6 U/mg) und für *Crotalus* etwas höher, nämlich bei 1,9 U/mg (Standardabweichung: 0,6 U/mg) (s. Tabellen 3 und 4) lag.

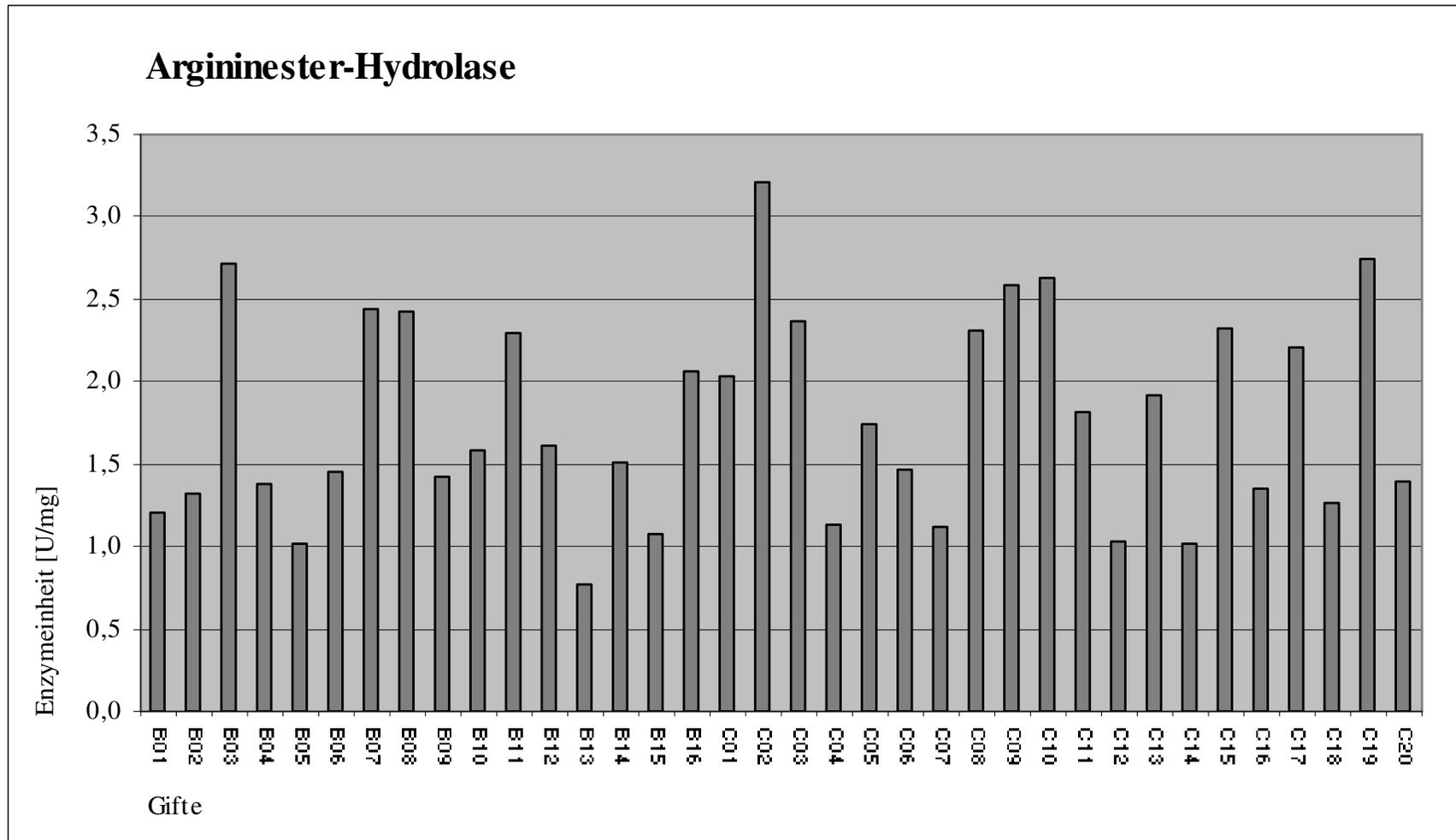


Abbildung 1: Arginester-Hydrolase-Aktivität der Rohgifte von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox*

### 3.1.2 Casein-Hydrolyse

Bei diesem Versuch stellten Gift C06 mit 6076,3 U/mg und B01 mit 745,0 U/mg die beiden Extremwerte dar. Desweiteren zeigten die Proben C14 (5570,0 U/mg), B05 (5277,5 U/mg), C08 (5223,8 U/mg), C05 (5165,0 U/mg) und C20 (5025,0) relativ hohe Aktivität (s. Abbildung 2).

Verglichen mit den Giften von *Crotalus atrox* (Mittelwert: 4033,6 U/mg; Standardabweichung: 1092,4 U/mg), erwiesen sich die Gifte von *Bothrops asper* im Mittel (2308,7 U/mg; Standardabweichung: 1075,6 U/mg) als geringer aktiv (s. Tabelle 3 und 4). Der Mittelwert aus allen Proben betrug 3266,9 U/mg bei einer Standardabweichung von 1382,7 U/mg. Wenngleich die *Bothrops*-Gifte insgesamt weniger Enzymaktivität aufwiesen, so gab es doch zwei Ausnahmen: Wie in der Abbildung 2 erkennbar, waren die Proben B05 und B09 als einzige sehr viel aktiver. Im Gegensatz hierzu war unter den *Crotalus*-Giften C15 mit auffallend geringer Aktivität vorhanden.

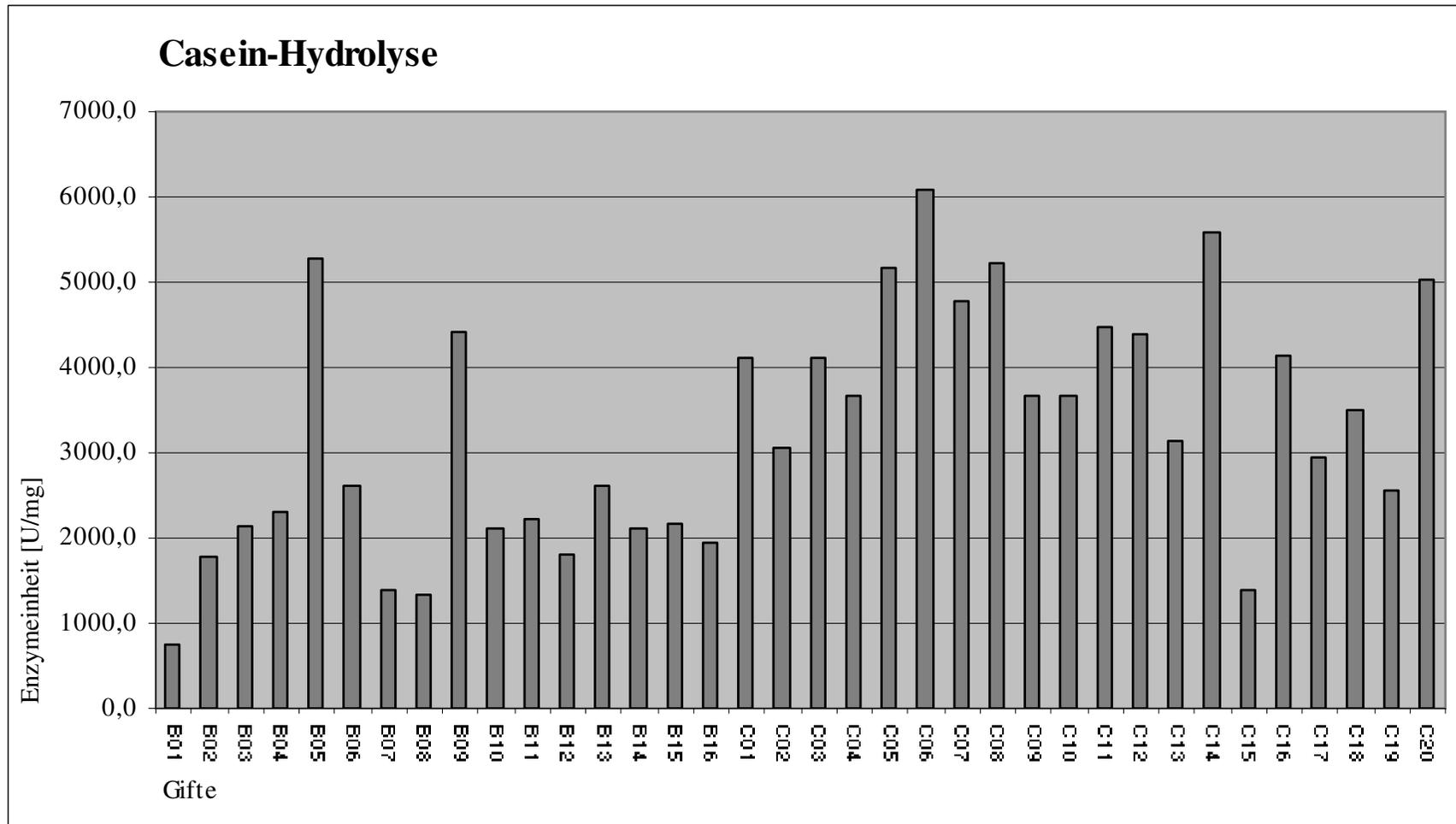
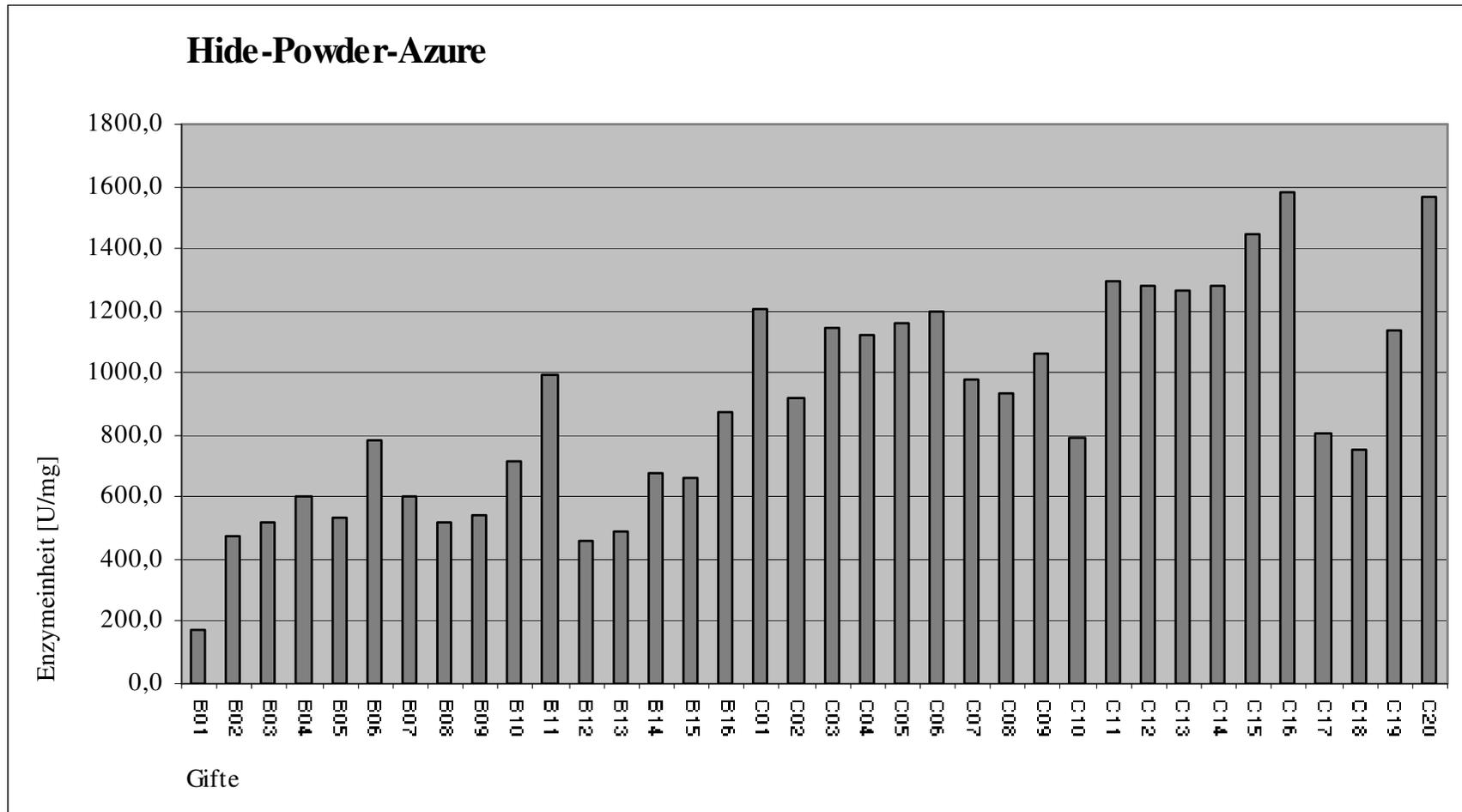


Abbildung 2: Casein-Hydrolyse-Aktivität der Rohgifte von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox*

### 3.1.3 Hide-Powder-Azure

Für diese proteolytische Aktivität konnte ein Maximum von 1580,8 U/mg (C16) und ein Minimum von 173,9 U/mg (B01) beobachtet werden. Weiterhin erwiesen sich die Gifte C20 (1563,8 U/mg) und C15 (1446,0 U/mg) als sehr aktiv (s. Abbildung 3).

Es fiel auf, dass die Gifte von *Crotalus atrox* in ihrer Gesamtheit weit aktiver waren als die von *Bothrops asper*: So betrug der Mittelwert aus allen *Crotalus* 1146,3 U/mg (Standardabweichung 230,4 U/mg) und der Mittelwert aus allen *Bothrops* 601,9 U/mg (Standardabweichung 183,9 U/mg) (s. Tabellen 3 und 4), wobei der Mittelwert aus allen Proben 904,3 U/mg (Standardabweichung 343,1 U/mg) betrug.



**Abbildung 3: Hide-Powder-Azure-Aktivität der Rohgifte von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox***

#### 3.1.4 Fibrinogen-Koagulase

Es wurden Werte bis zu 16,7 U/mg (B10) verzeichnet. Als besonders aktiv fiel die Probe C18 mit einer Enzymeinheit von 15,4 U/mg auf (s. Abbildung 4). Mit wenigen Ausnahmen wies keines der Gifte von *Crotalus atrox* eine Fibrinogen-Koagulase-Aktivität auf; die Bildung eines Fibringerinnsels im Versuch unterblieb völlig. Vier Ausnahmen, das heißt *Crotalus*-Proben, die eine entsprechende Aktivität besaßen, stellten C01 (7,9 U/mg), C02 (7,6 U/mg), C15 (8,1 U/mg) und C18 (15,4 U/mg) dar.

Während der Mittelwert für die Gifte von *Bothrops asper* 10,7 U/mg bei einer Standardabweichung von 2,4 U/mg betrug, errechnete sich für *Crotalus atrox* lediglich 1,9 U/mg (Standardabweichung: 4,2 U/mg) (s. Tabellen 3 und 4).

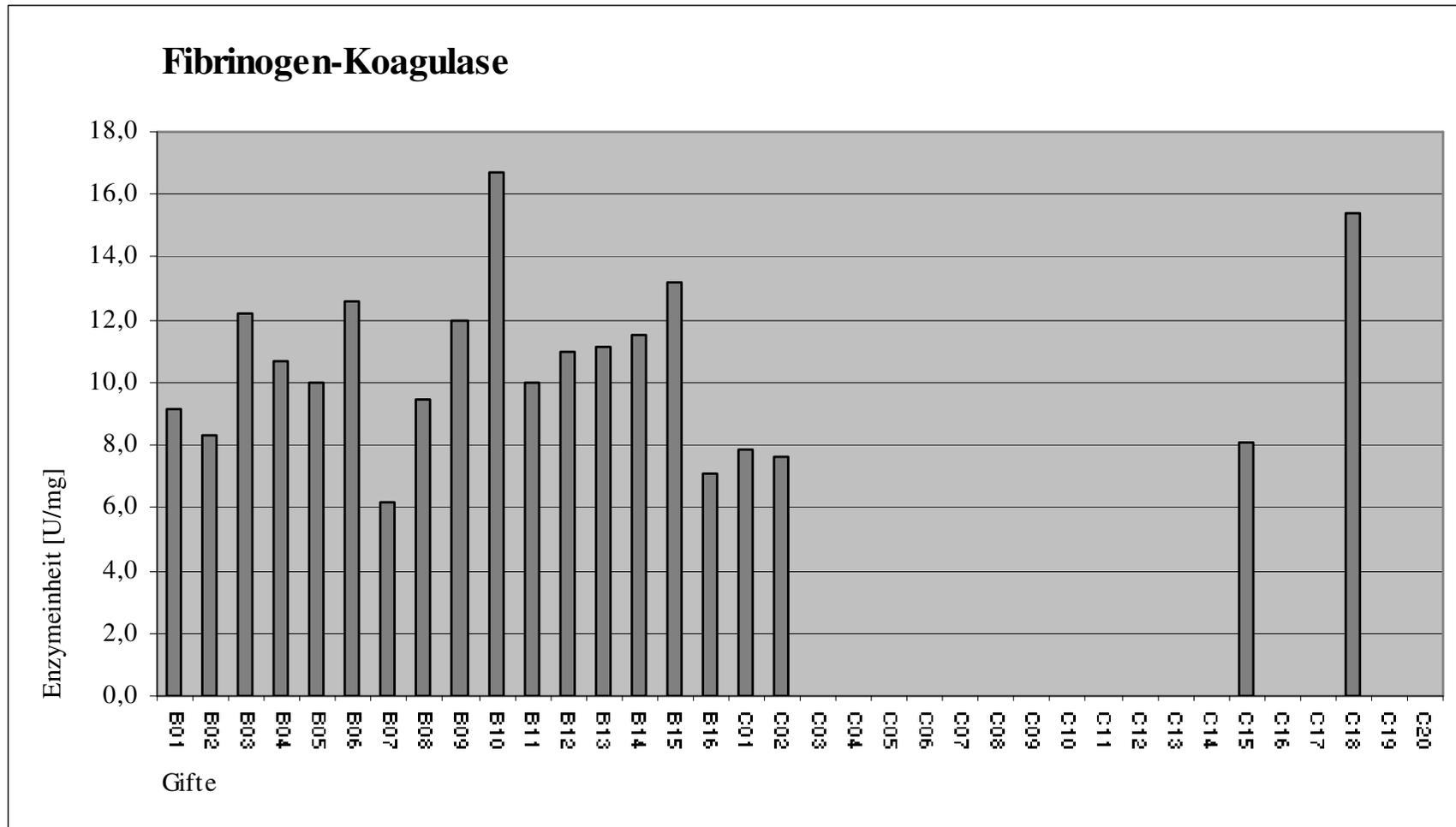
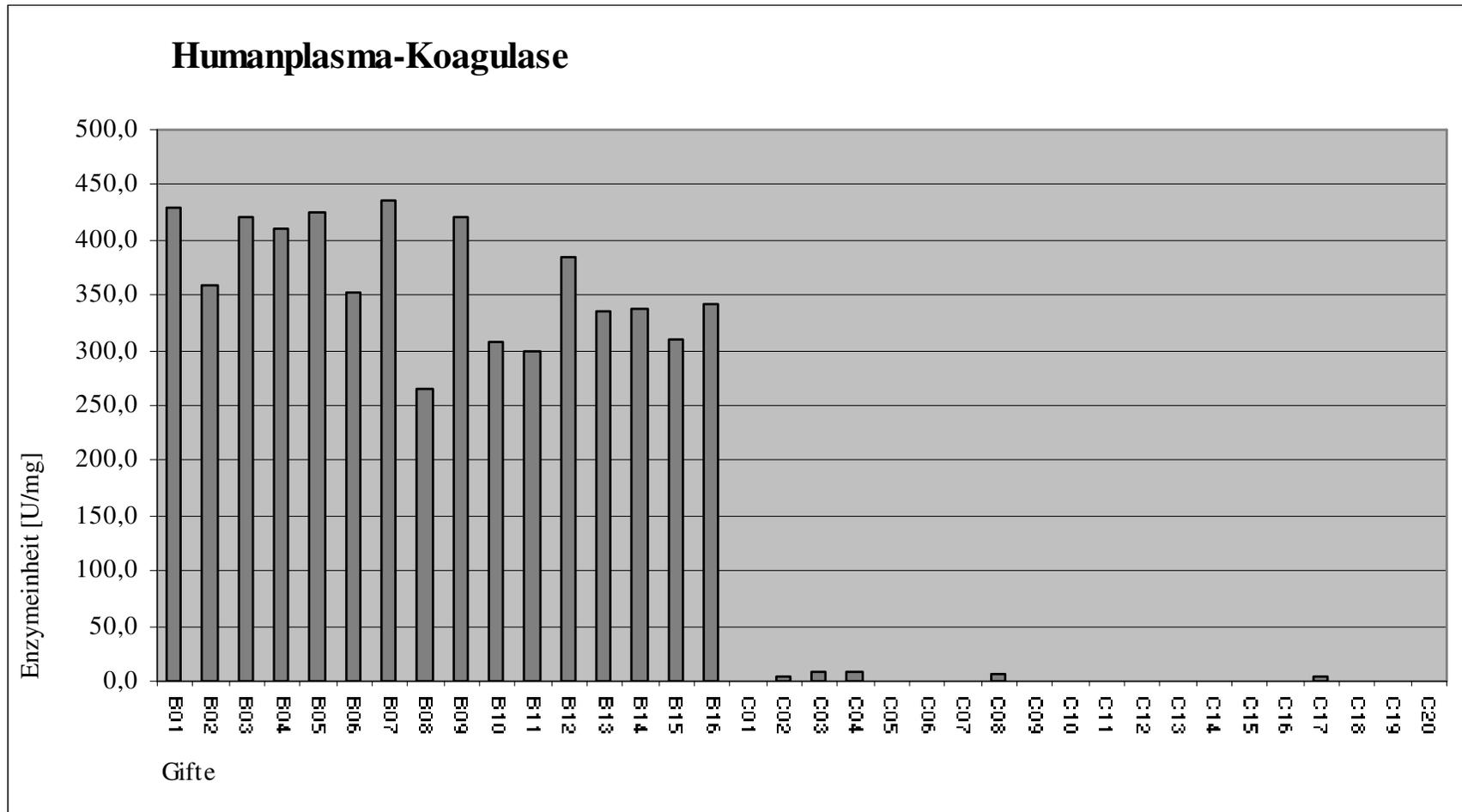


Abbildung 4: Fibrinogen-Koagulase-Aktivität der Rohgifte von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox*

### 3.1.5 Humanplasma-Koagulase

Das Gift B07 besaß von allen untersuchten Proben die größte Humanplasma-Koagulase-Aktivität von 436,4 U/mg. Ebenfalls sehr aktiv waren: B01 (428,6 U/mg), B05 (424,8 U/mg), B03 und B09 (beide jeweils 421,1 U/mg) und B04 (410,3 U/mg). Die Gifte C02, C03, C04, C08 und C17 waren die einzigen Vertreter von *Crotalus atrox*, die enzymatische Aktivität besaßen im Bereich von allerdings nur 4,3 bis 8,2 U/mg (s. Abbildung 5). Für die *Bothrops*-Proben lag der Mittelwert bei 364,8 U/mg (Standardabweichung: 52,6 U/mg).



**Abbildung 5: Humanplasma-Koagulase-Aktivität der Rohgifte von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox***

### 3.1.6 L-Aminosäureoxidase

Die höchste Aktivität wurde für das Gift C10 gemessen (s. Abbildung 6). Als besonders aktiv erwiesen sich weiterhin C15 (54,6 mU/mg) und C01 (49,9 mU/mg) während C18 (1,1 mU/mg) und C13 (2,4 mU/mg) auffallend wenig Aktivität zeigten (s. Tabelle 4).

Gifte von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox* lieferten insgesamt annähernd ähnliche Ergebnisse: Die Mittelwerte für die Gifte der beiden Arten betragen 29,6 mU/mg (*Bothrops*) beziehungsweise 28,9 mU/mg (*Crotalus*). Hierbei wichen die Messwerte bei *Bothrops asper* um durchschnittlich 6,2 mU/mg und bei *Crotalus* um 15,0 mU/mg vom arithmetischen Mittelwert ab.

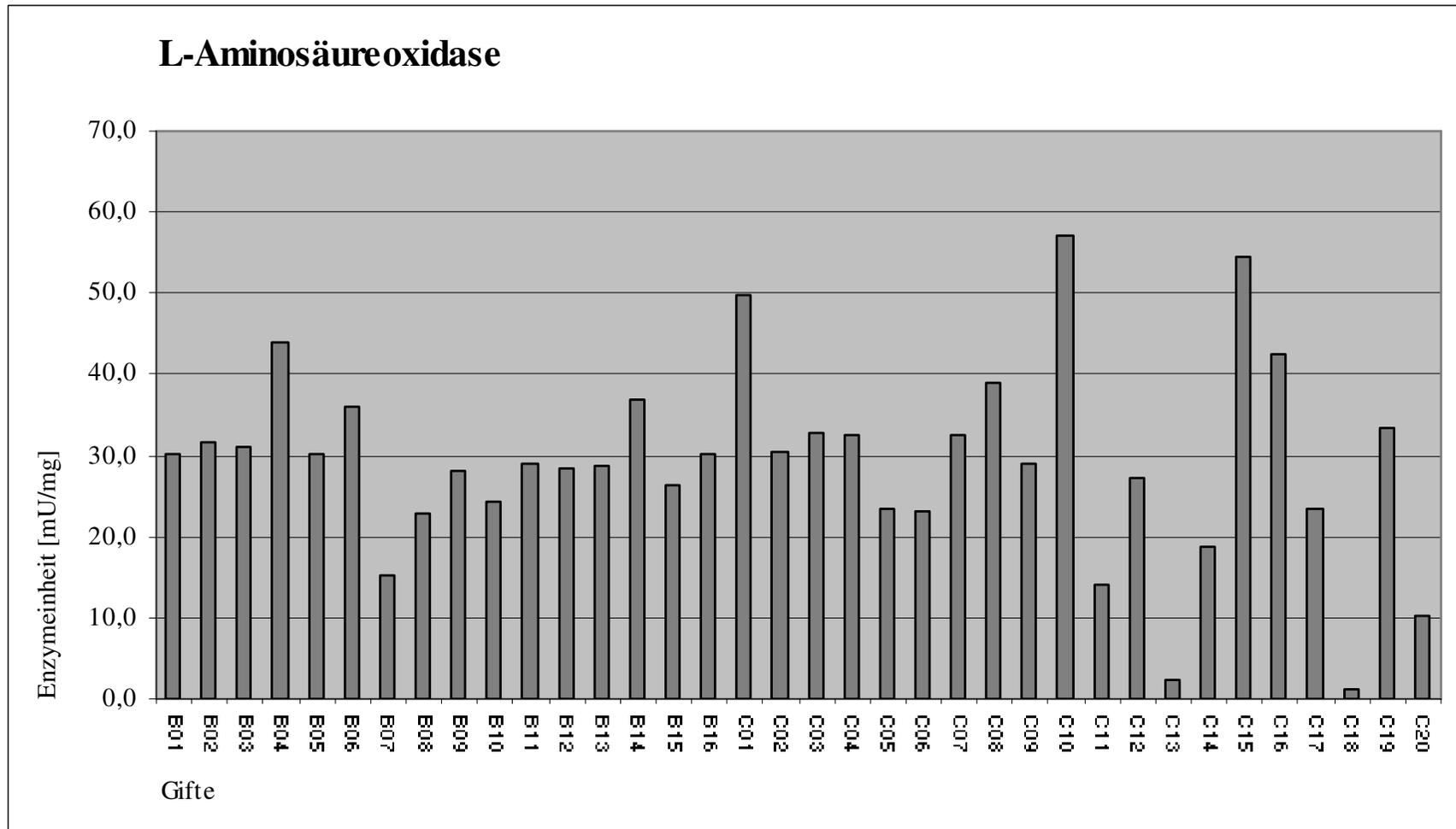
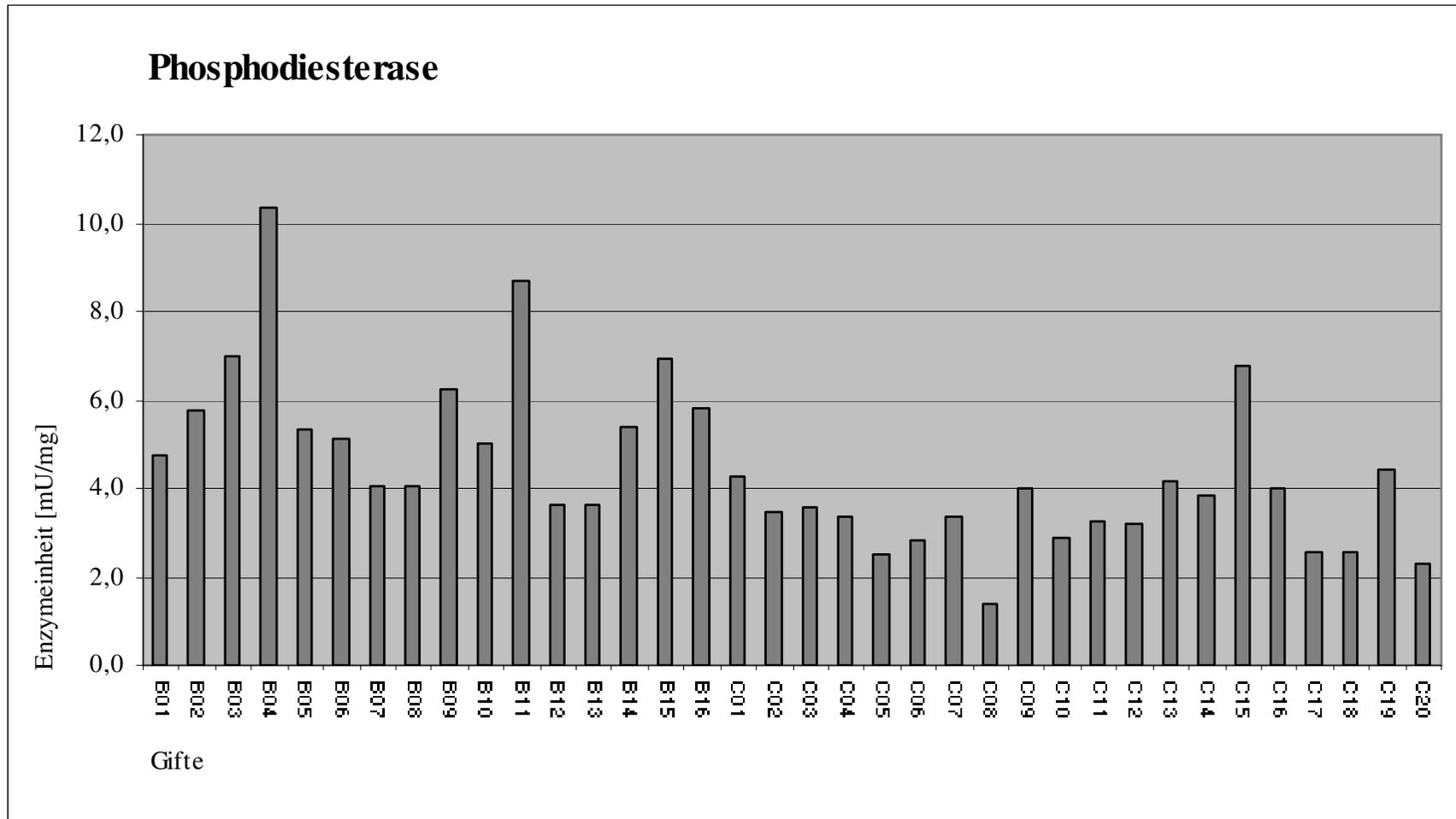


Abbildung 6: L-Aminosäureoxidase-Aktivität der Rohgifte von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox*

### 3.1.7 Phosphodiesterase

Alle untersuchten Gifte wiesen Phosphodiesterase-Aktivität auf, sehr aktiv war B04 (10,4 mU/mg), wenig aktiv C08 (1,4 mU/mg). Zu nennen ist zusätzlich B11 mit einer relativ hohen Enzymaktivität von 8,7 mU/mg (s. Abbildung 7).

Das arithmetische Mittel für alle Proben lag bei 4,5 mU/mg; die entsprechende Standardabweichung bei 1,8 mU/mg. Für *Bothrops asper* errechnete sich ein Mittelwert von 5,7 mU/mg (Standardabweichung: 1,8 mU/mg), für *Crotalus atrox* 3,4 mU/mg (Standardabweichung: 1,1 mU/mg) (s. Tabellen 3 und 4).

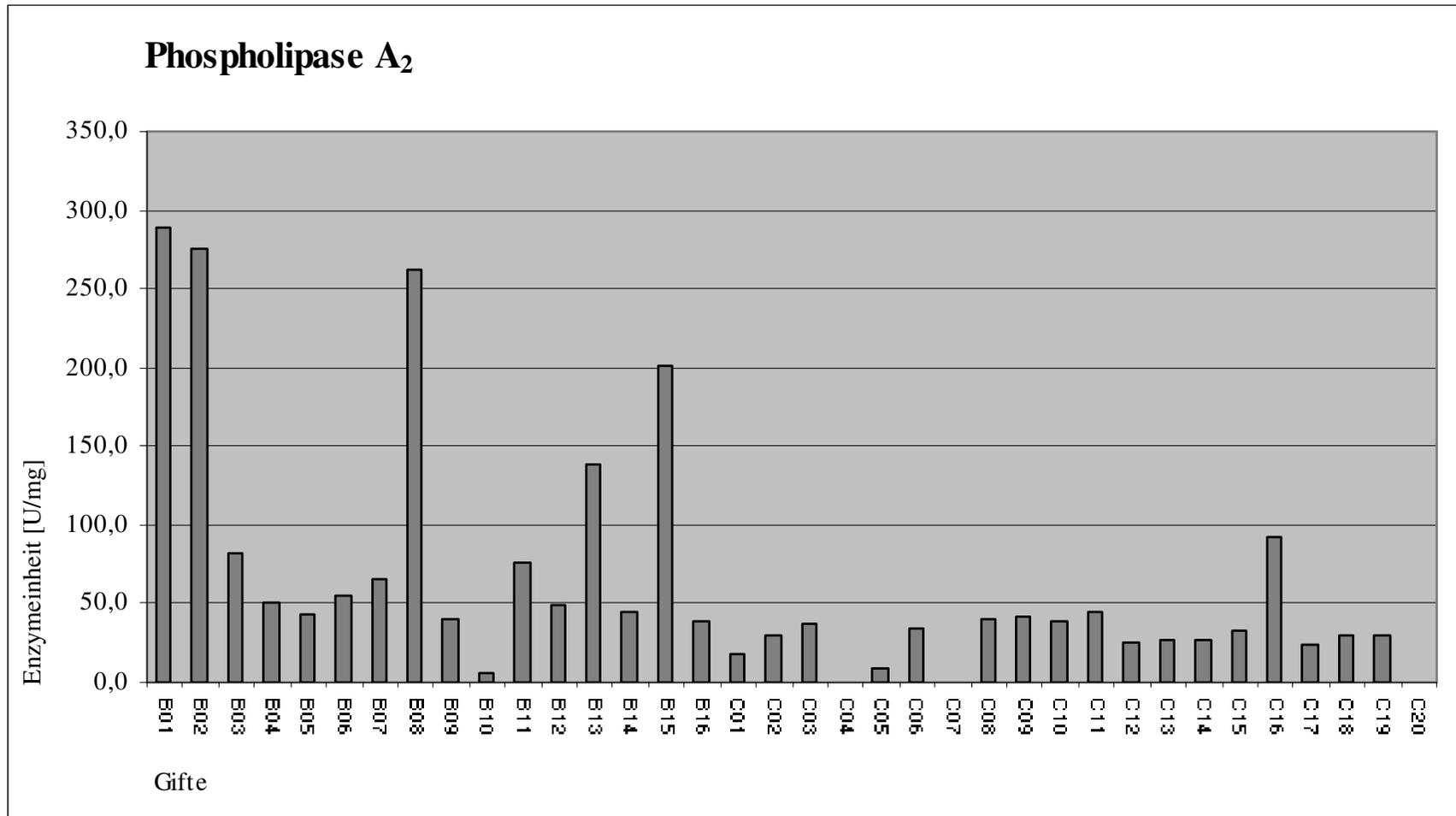


**Abbildung 7: Phosphodiesterase-Aktivität der Rohgifte von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox***

### 3.1.8 Phospholipase A<sub>2</sub>

Diese Enzym-Aktivität wurde nicht bei jeder der untersuchten Proben beobachtet: C04, C07 und C20 erwiesen sich als inaktiv. Ein Maximum hingegen stellte B01 mit einer Enzymaktivität von 289,2 U/mg dar. Weiterhin erwähnenswert, weil besonders aktiv, waren B02 (275,0 U/mg) und B08 (262,8 U/mg); weniger aktiv waren B10 (5,5 U/mg) und C05 (9,6 U/mg) (s. Abbildung 8 und Tabellen 3 und 4).

Unter den *Bothrops*-Giften wurden zum Teil recht hohe Werte gemessen, was sich nicht zuletzt im Mittelwert für alle Gifte dieser Art widerspiegelte: 107,3 U/mg (Standardabweichung: 92,0 U/mg) im Vergleich zu 29,0 U/mg für *Crotalus* (Standardabweichung: 19,7 U/mg). Der Mittelwert für alle Proben ungeachtet ihrer Art betrug 63,8 U/mg und dessen Standardabweichung 74,1 U/mg.



**Abbildung 8: Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität der Rohgifte von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox***

<b>Gift</b>	<b>Argininester-Hydrolase [U/mg]</b>	<b>Casein-Hydrolyse [U/mg]</b>	<b>Hide-Powder-Azure [U/mg]</b>	<b>Fibrinogen-Koagulase [U/mg]</b>	<b>Humanplasma-Koagulase [U/mg]</b>	<b>L-Aminosäure-oxidase [mU/mg]</b>	<b>Phosphodiesterase [mU/mg]</b>	<b>Phospholipase [U/mg]</b>
B01	1,2	745,0	173,9	9,1	428,6	30,2	4,8	289,2
B02	1,3	1783,8	472,8	8,3	358,2	31,6	5,8	275,0
B03	2,7	2127,5	520,0	12,2	421,1	31,1	7,0	82,5
B04	1,4	2292,5	601,9	10,7	410,3	44,1	10,4	50,2
B05	1,0	5277,5	534,3	10,0	424,8	30,2	5,3	43,5
B06	1,5	2617,5	785,4	12,6	352,9	36,1	5,1	55,1
B07	2,4	1380,0	603,1	6,2	436,4	15,1	4,0	64,8
B08	2,4	1328,8	521,5	9,5	265,2	22,9	4,1	262,8
B09	1,4	4420,0	540,9	12,0	421,1	28,0	6,2	39,5
B10	1,6	2102,5	716,8	16,7	307,7	24,3	5,0	5,5
B11	2,3	2213,8	994,1	10,0	300,0	29,0	8,7	76,1
B12	1,6	1816,3	459,4	11,0	384,0	28,3	3,6	49,4
B13	0,8	2603,8	485,9	11,2	335,7	28,8	3,6	138,7
B14	1,5	2102,5	679,0	11,5	338,0	36,8	5,4	44,8
B15	1,1	2176,3	665,3	13,2	309,7	26,3	6,9	200,8
B16	2,1	1951,3	876,3	7,1	342,9	30,1	5,8	38,5
<b>Mittelwert</b>	1,6	2308,7	601,9	10,7	364,8	29,5	5,7	107,3
<b>Standard-abweichung</b>	0,6	1075,6	183,9	2,4	52,6	6,2	1,8	92,0

**Tabelle 3: Überblick über die Enzymaktivitäten von *Bothrops asper***

<b>Gift</b>	<b>Argininester-Hydrolase [U/mg]</b>	<b>Casein-Hydrolyse [U/mg]</b>	<b>Hide-Powder-Azure [U/mg]</b>	<b>Fibrinogen-Koagulase [U/mg]</b>	<b>Humanplasma-Koagulase [U/mg]</b>	<b>L-Aminosäure-oxidase [mU/mg]</b>	<b>Phosphodiesterase [mU/mg]</b>	<b>Phospholipase [U/mg]</b>
C01	2,0	4125,0	1201,5	7,9	0,0	49,9	4,3	18,1
C02	3,2	3067,5	921,9	7,6	4,3	30,5	3,5	29,3
C03	2,4	4107,5	1148,0	0,0	8,0	32,9	3,6	37,0
C04	1,1	3672,5	1118,6	0,0	8,2	32,5	3,4	0,0
C05	1,7	5165,0	1159,3	0,0	0,0	23,3	2,5	9,6
C06	1,5	6076,3	1195,6	0,0	0,0	23,0	2,8	33,9
C07	1,1	4778,8	982,6	0,0	0,0	32,6	3,3	0,0
C08	2,3	5223,8	933,9	0,0	6,2	39,0	1,4	40,9
C09	2,6	3667,5	1064,8	0,0	0,0	29,0	4,0	41,4
C10	2,6	3671,3	791,3	0,0	0,0	57,2	2,9	38,8
C11	1,8	4470,0	1294,6	0,0	0,0	14,0	3,2	44,5
C12	1,0	4387,5	1283,0	0,0	0,0	27,3	3,2	25,5
C13	1,9	3141,3	1268,6	0,0	0,0	2,4	4,2	27,5
C14	1,0	5570,0	1278,0	0,0	0,0	18,7	3,8	26,5
C15	2,3	1395,0	1446,0	8,1	0,0	54,6	6,8	32,4
C16	1,3	4133,8	1580,8	0,0	0,0	42,5	4,0	91,8
C17	2,2	2931,3	803,9	0,0	5,1	23,3	2,6	23,9
C18	1,3	3503,8	750,3	15,4	0,0	1,1	2,6	29,8
C19	2,8	2558,8	1139,1	0,0	0,0	33,5	4,4	29,3
C20	1,4	5025,0	1563,8	0,0	0,0	10,3	2,3	0,0
<b>Mittelwert</b>	1,9	4033,6	1146,3	1,9	1,6	28,9	3,4	29,0
<b>Standard-abweichung</b>	0,6	1092,4	230,4	4,2	2,9	15,0	1,1	19,7

**Tabelle 4: Überblick über die Enzymaktivitäten von *Crotalus atrox***

Gift	Argininester-Hydrolase	Casein-Hydrolyse	Hide-Powder-Azure	Fibrinogen-Koagulase	Humanplasma-Koagulase	L-Aminosäure-oxidase	Phospho-dieseterase	Phospho-lipase
B01	+	+	+	++	+++	++	++	+++
B02	+	+	+	++	+++	++	++	+++
B03	+++	+	+	+++	+++	++	++	+
B04	+	+	+	++	+++	+++	+++	+
B05	+	+++	+	++	+++	++	++	+
B06	+	++	++	+++	+++	+++	++	+
B07	+++	+	+	++	+++	+	+	+
B08	+++	+	+	++	++	++	+	+++
B09	+	+++	+	+++	+++	++	++	+
B10	+	+	++	+++	+++	++	++	+
B11	++	+	++	++	+++	++	+++	+
B12	++	+	+	++	+++	++	+	+
B13	+	++	+	+++	+++	++	+	++
B14	+	+	++	+++	+++	+++	++	+
B15	+	+	++	+++	+++	++	++	+++
B16	++	+	++	++	+++	++	++	+

**Tabelle 5: Semiquantitativer Überblick über die Enzymaktivitäten von *Bothrops asper*:**

+++ sehr aktiv, ++ mäßig aktiv, + wenig aktiv, - nicht aktiv

Gift	Argininester-Hydrolase	Casein-Hydrolyse	Hide-Powder-Azure	Fibrinogen-Koagulase	Humanplasma-Koagulase	L-Aminosäure-oxidase	Phosphodiesterase	Phospholipase
C01	++	++	+++	++	-	+++	+	+
C02	+++	++	++	++	+	++	+	+
C03	++	++	+++	-	+	++	+	+
C04	+	++	+++	-	+	++	+	-
C05	++	+++	+++	-	-	++	+	+
C06	+	+++	+++	-	-	++	+	+
C07	+	+++	++	-	-	++	+	-
C08	++	+++	++	-	+	+++	+	+
C09	+++	++	++	-	-	++	+	+
C10	+++	++	++	-	-	+++	+	+
C11	++	+++	+++	-	-	+	+	+
C12	+	+++	+++	-	-	++	+	+
C13	++	++	+++	-	-	+	+	+
C14	+	+++	+++	-	-	+	+	+
C15	++	+	+++	++	-	+++	++	+
C16	+	++	+++	-	-	+++	+	+
C17	++	++	++	-	+	++	+	+
C18	+	++	++	+++	-	+	+	+
C19	+++	++	+++	-	-	++	++	+
C20	+	+++	+++	-	-	+	+	-

**Tabelle 6: Semiquantitativer Überblick über die Enzymaktivitäten von *Crotalus atrox*:**

**+++ sehr aktiv, ++ mäßig aktiv, + wenig aktiv, - nicht aktiv**

### 3.2 Fraktionierung der Gifte durch Anionenaustausch-Chromatographie

Fraktioniert wurden die Gifte von *Bothrops asper*, mit Ausnahme von B02 und B04, da hierfür nicht mehr ausreichend Material zur Verfügung stand. Durchschnittlich konnten fünf Fraktionen gewonnen werden: Minimal drei (B06 und B15) und maximal sieben (B05; B10; B12 und B13) (s. Tabelle 7).

Mit den einzelnen Fraktionen wurden im Anschluss die Versuche zur Casein-Hydrolyse und Humanplasma-Koagulase durchgeführt. In den Abbildungen 9 bis 22 wurden die Elutionskurven der jeweiligen Gifte den Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen zugeordnet. Hierbei entsprach ein Peak in der Elutionskurve einer Fraktion. In den Tabellen 7 bis 10 wurden die Enzymaktivitäten der Fraktionen der Gifte von *Bothrops asper* noch einmal zusammengefasst.

#### 3.2.1 Casein-Hydrolyse

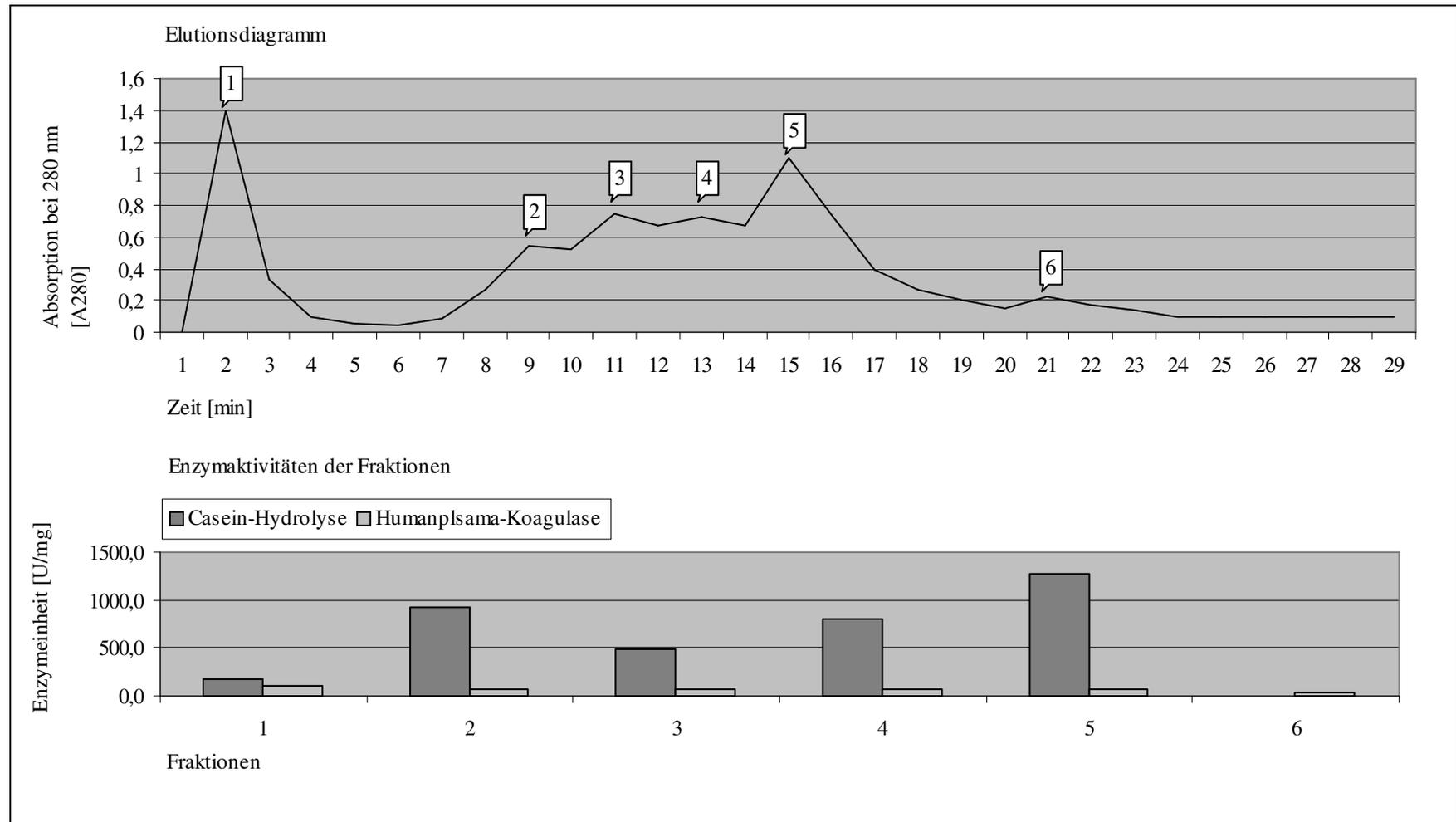
Bei den untersuchten Giften ließ sich bei den folgenden Fraktionen keine Aktivität nachweisen: Fraktion 6 von B01, Fraktion 5 von B03, Fraktionen 1; 5 und 7 von B05, Fraktion 5 von B07, Fraktionen 1; 2 und 4 von B08, Fraktion 7 von B10, Fraktionen 1; 2 und 3 von B11, Fraktion 7 von B13 und Fraktion 5 von B16 waren hier inaktiv (s. Tabelle 8). Fraktion 3 von B06 wies von allen untersuchten Fraktionen die höchste Casein-Hydrolyse-Aktivität (3295,8 U/mg) (s. Tabelle 7) auf.

Bei den Giften B08 und B11 konnte das Enzym gereinigt werden, das heißt Casein-Hydrolyse-Aktivität war nur in jeweils einer Fraktion nachzuweisen (bei B08 in Fraktion 3 und bei B11 in Fraktion 4).

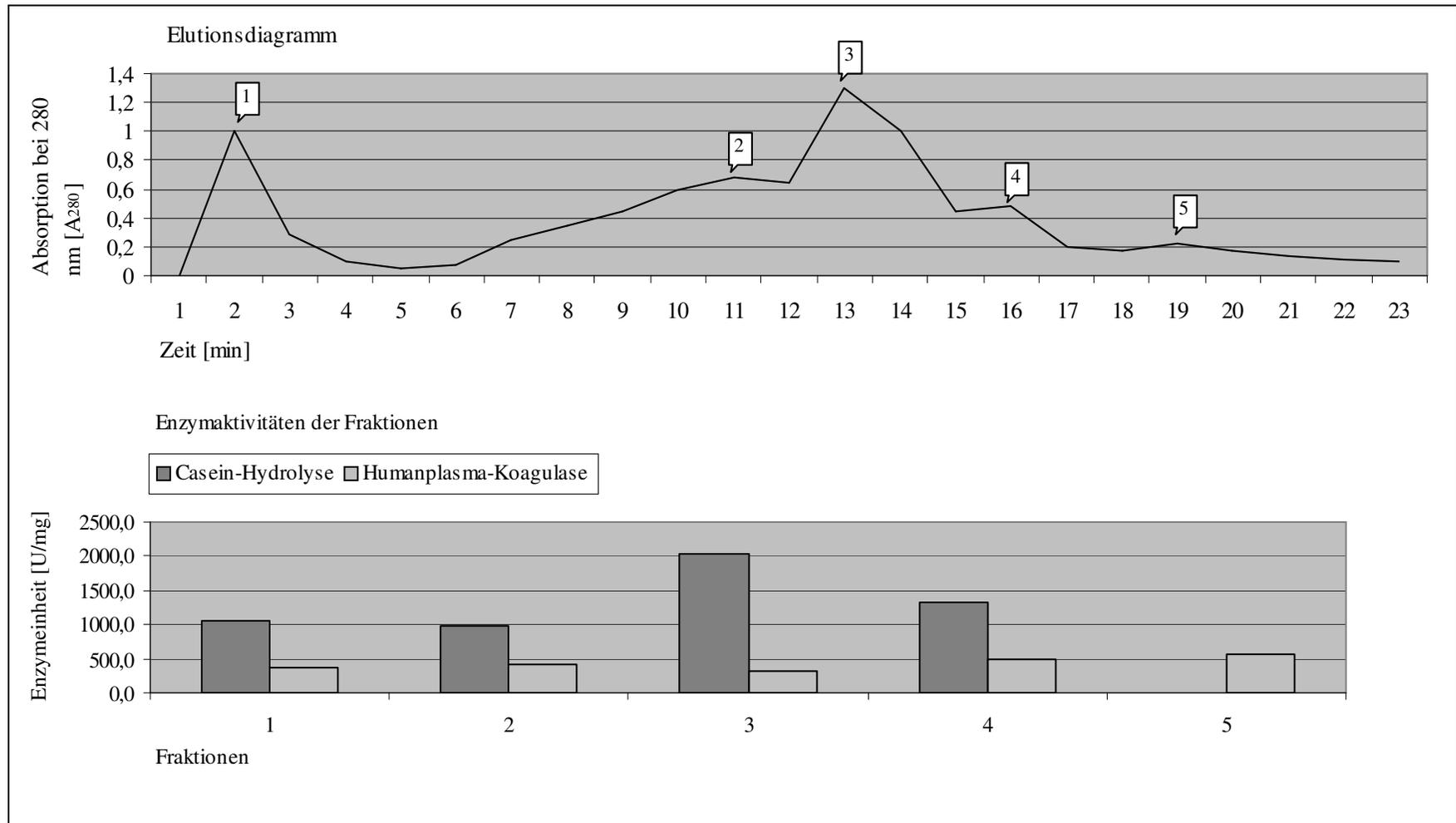
#### 3.2.2 Humanplasma-Koagulase

In allen Fraktionen der Gifte von *Bothrops asper* ließ sich Humanplasma-Koagulase-Aktivität nachweisen. Die Enzymaktivitäten lagen zwischen minimal 10,6 U/mg (Fraktion 3 von B11) und maximal 105,9 U/mg (Fraktion 3 von B13) (s. Tabelle 7 und 8).

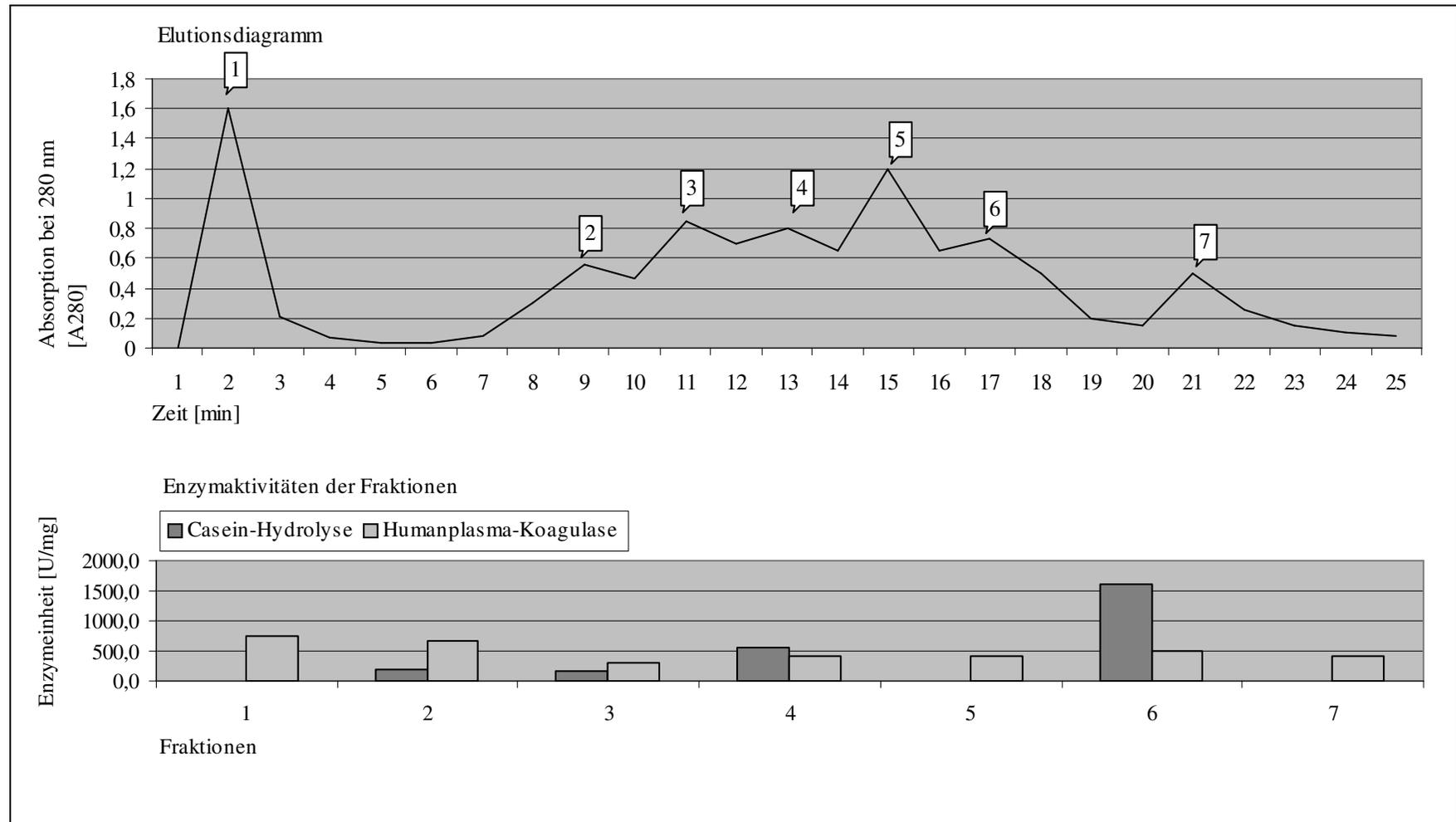
Bei keinem der Gifte konnte dieses Enzym gereinigt werden. Die Humanplasma-Koagulase-Aktivität verteilte sich jeweils auf mehrere oder alle Fraktionen.



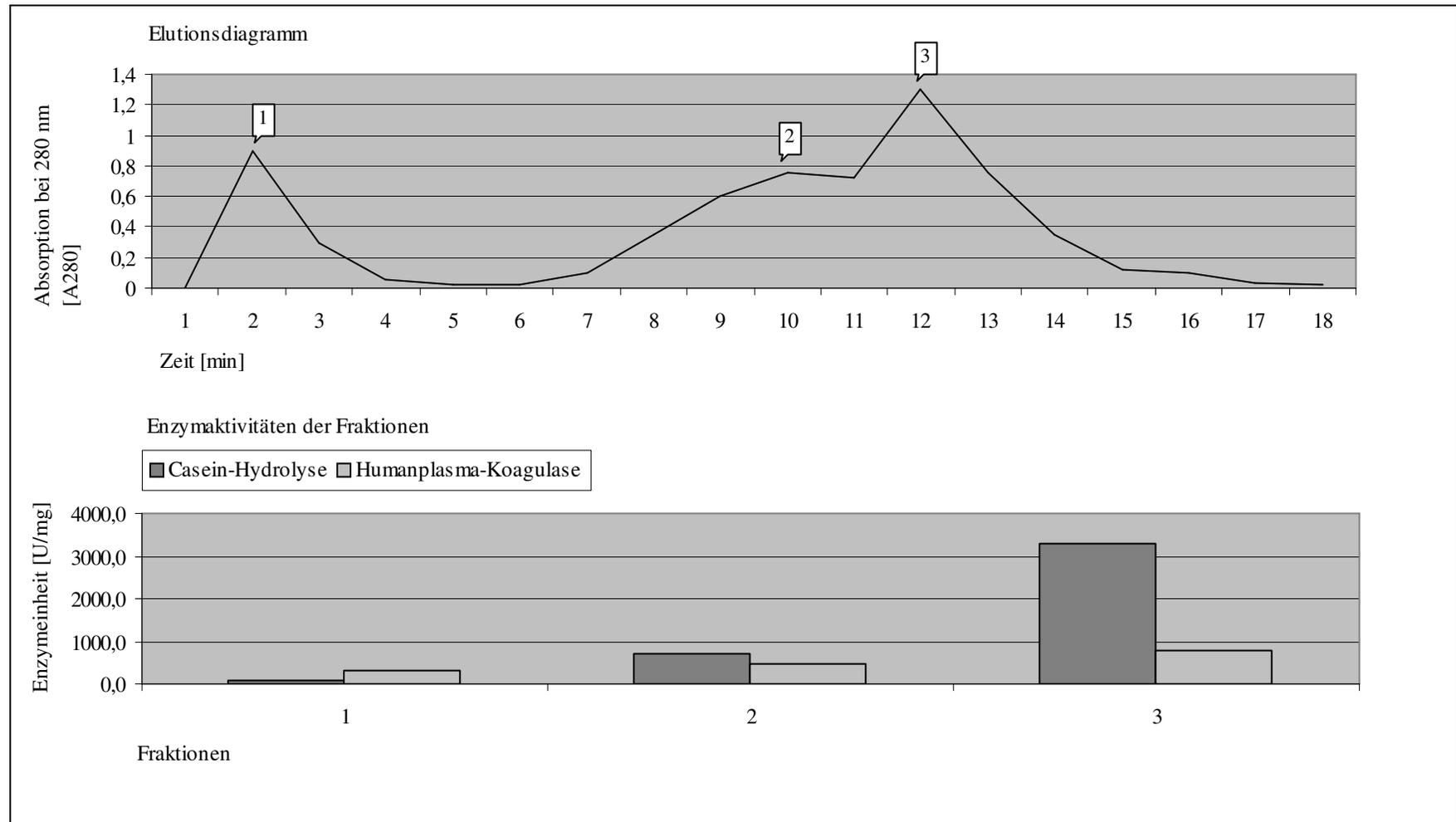
**Abbildung 9: Gift B01: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



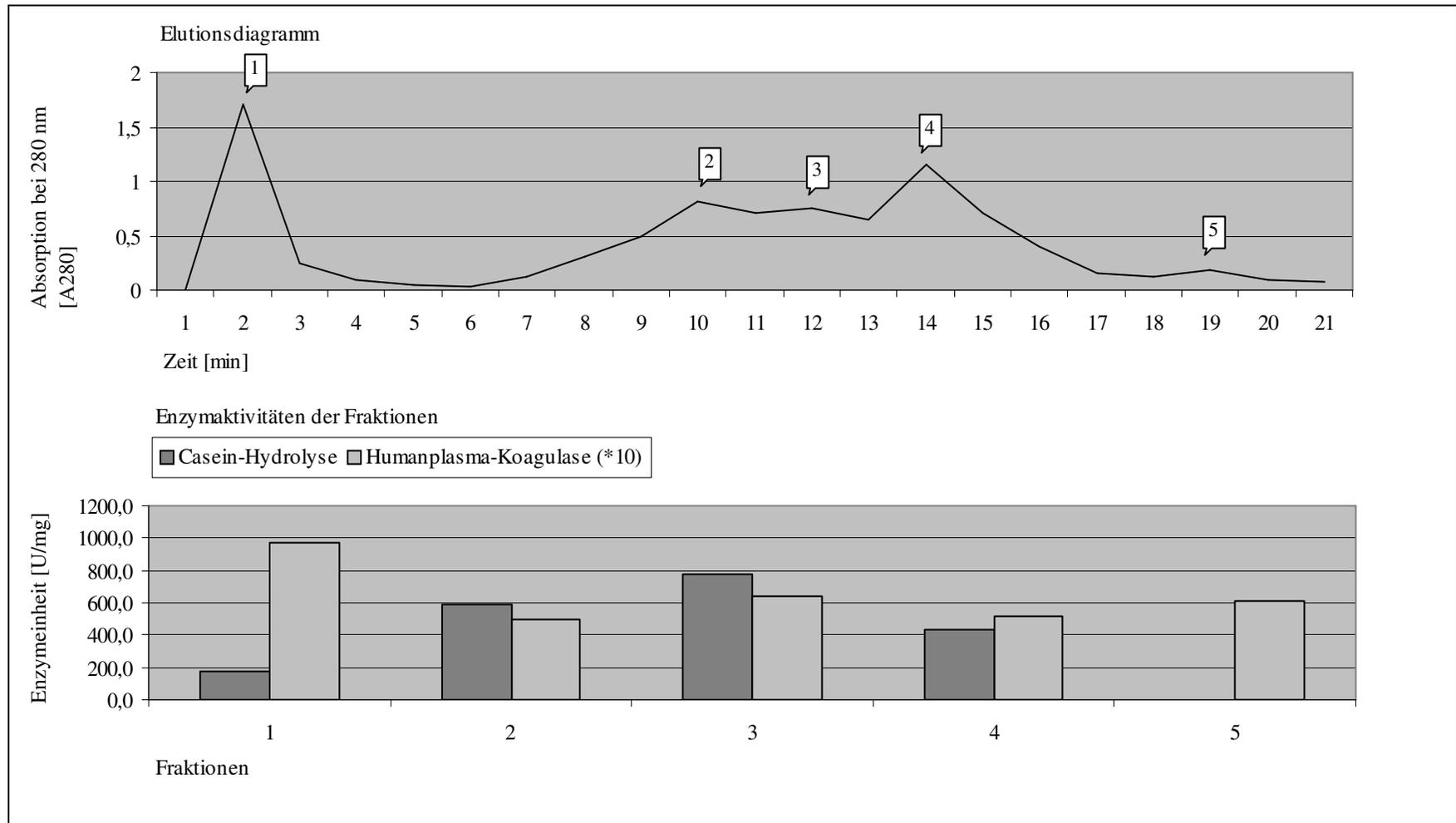
**Abbildung 10: Gift B03: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



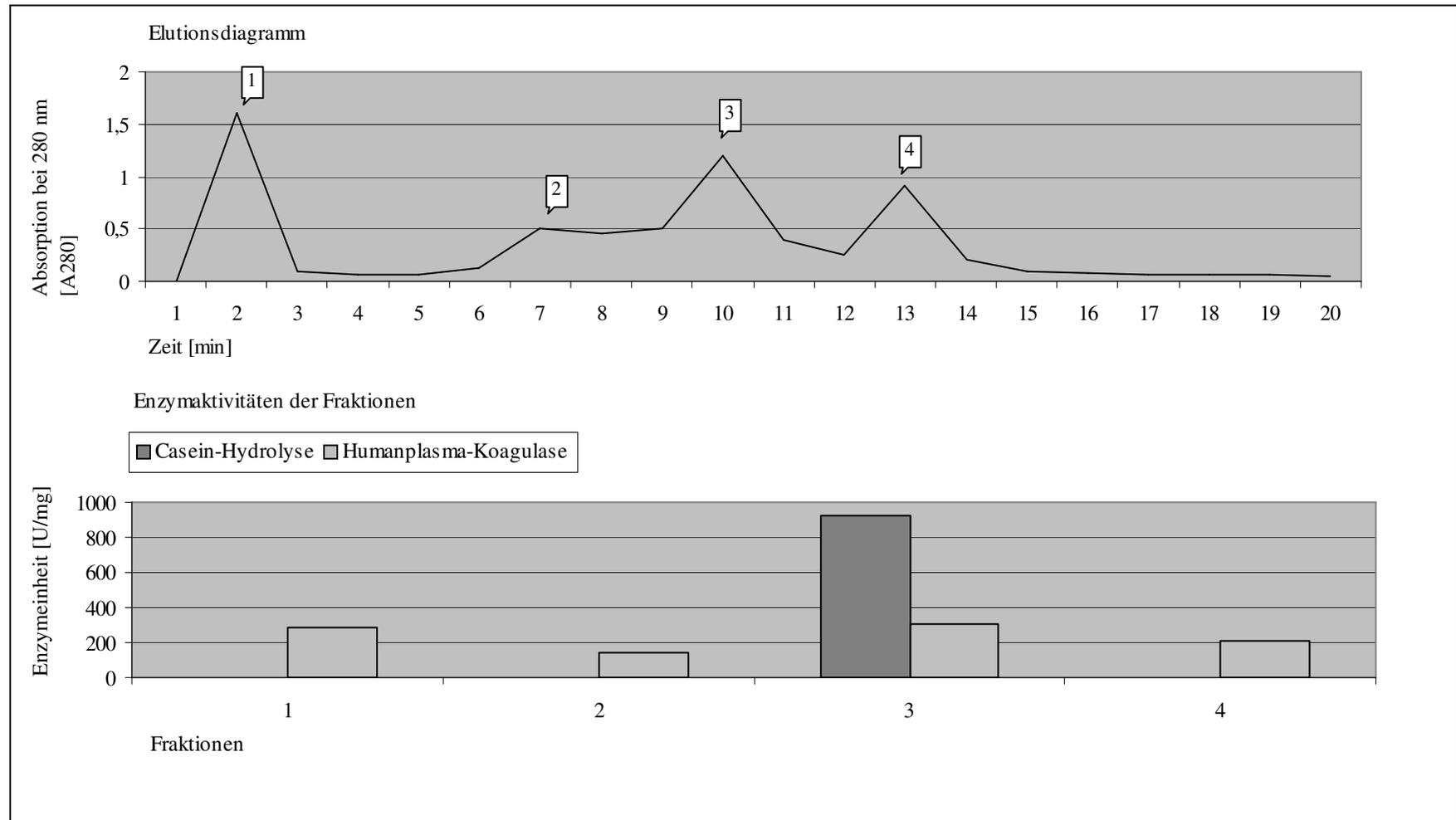
**Abbildung 11: Gift B05: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



**Abbildung 12: Gift B06: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



**Abbildung 13: Gift B07: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



**Abbildung 14: Gift B08: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**

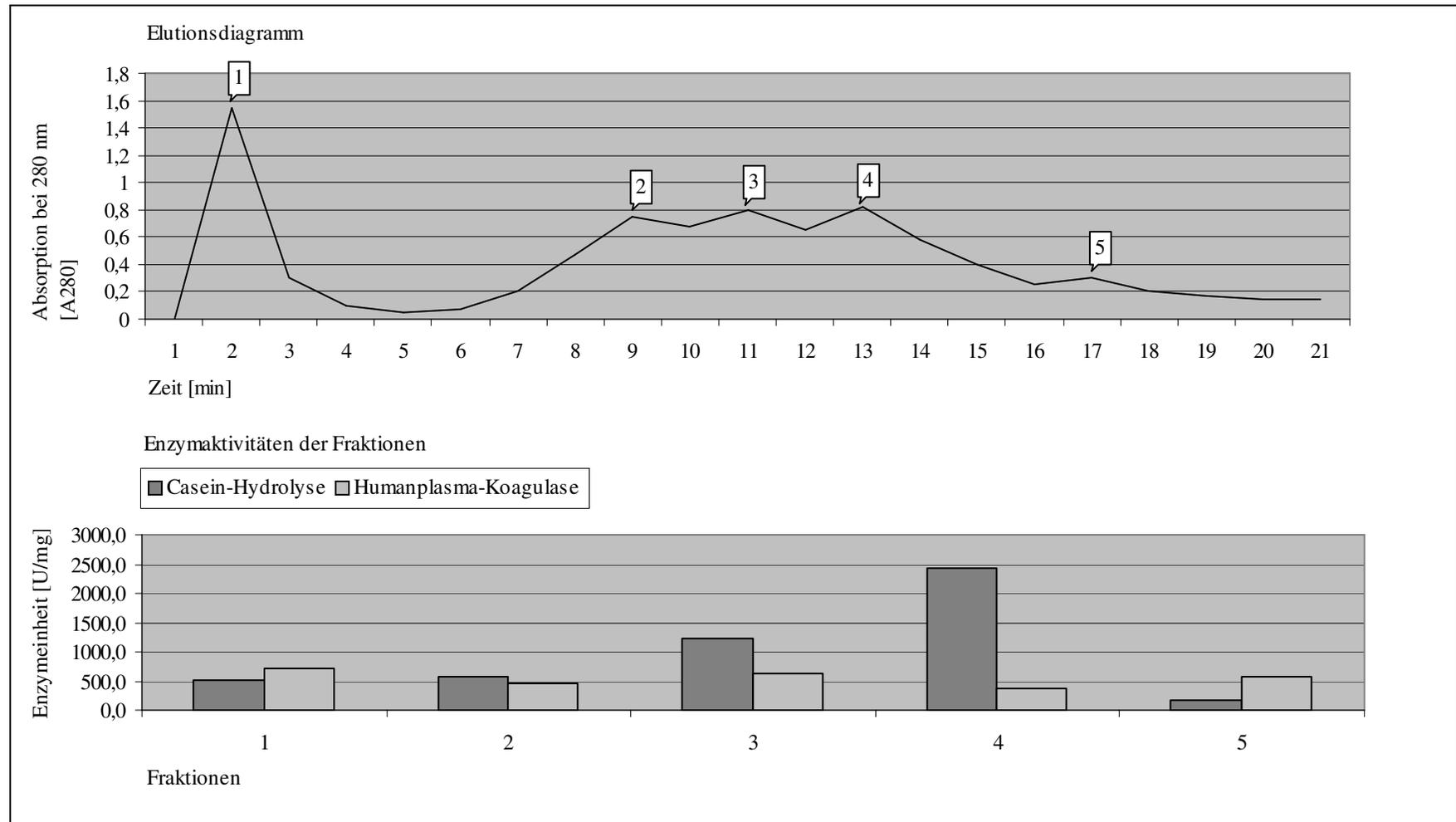
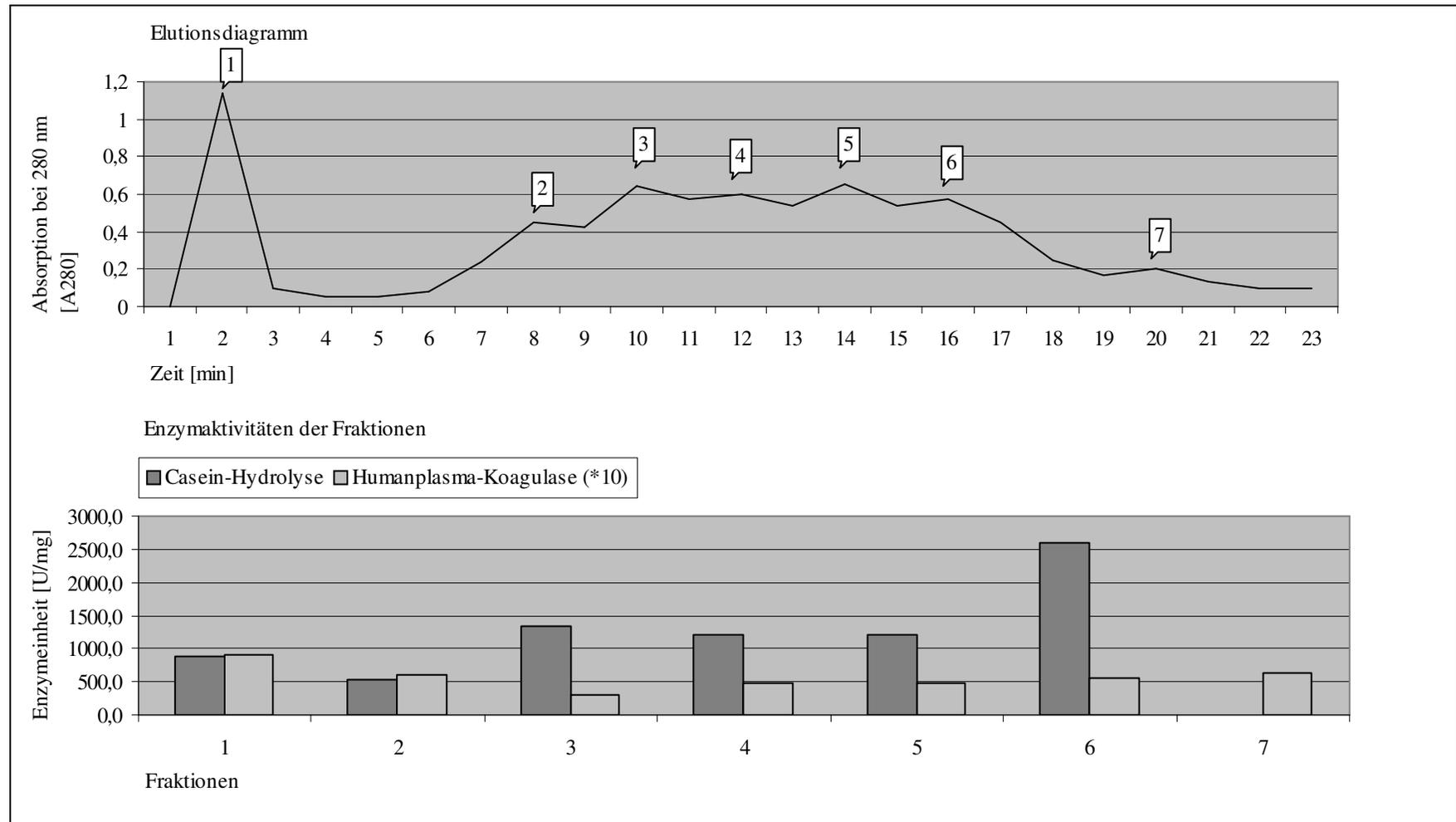
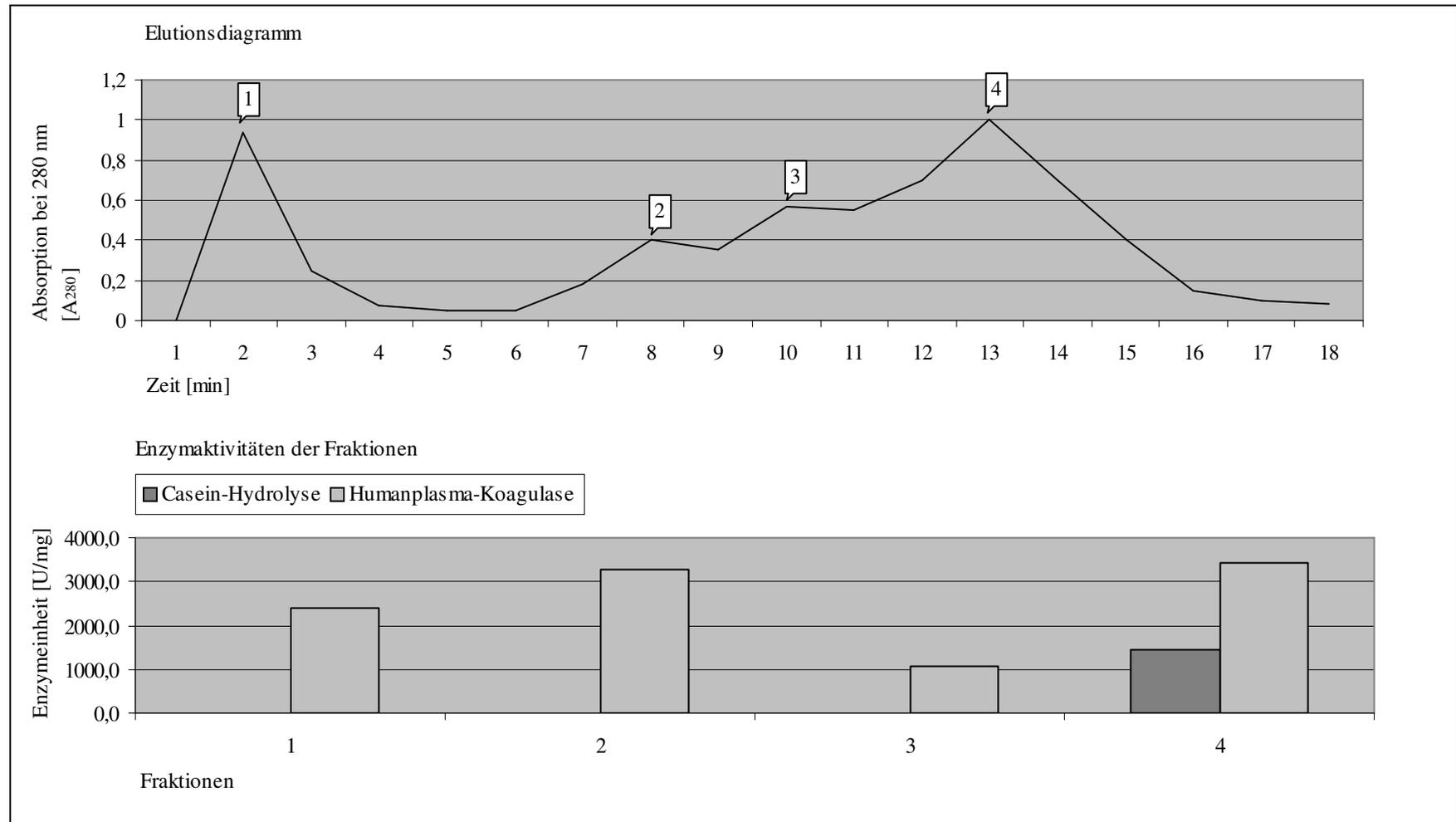


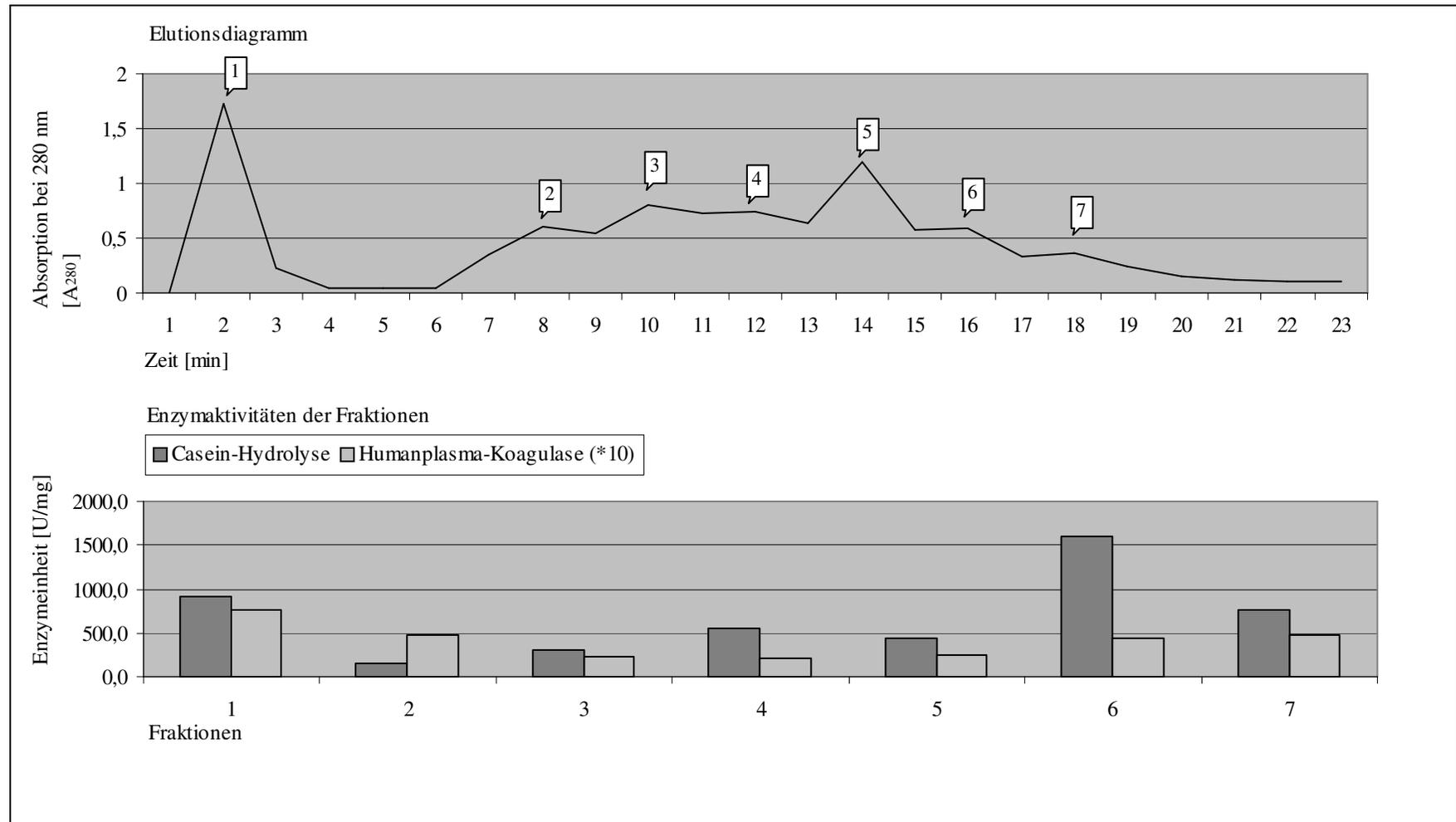
Abbildung 15: Gift B09: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten



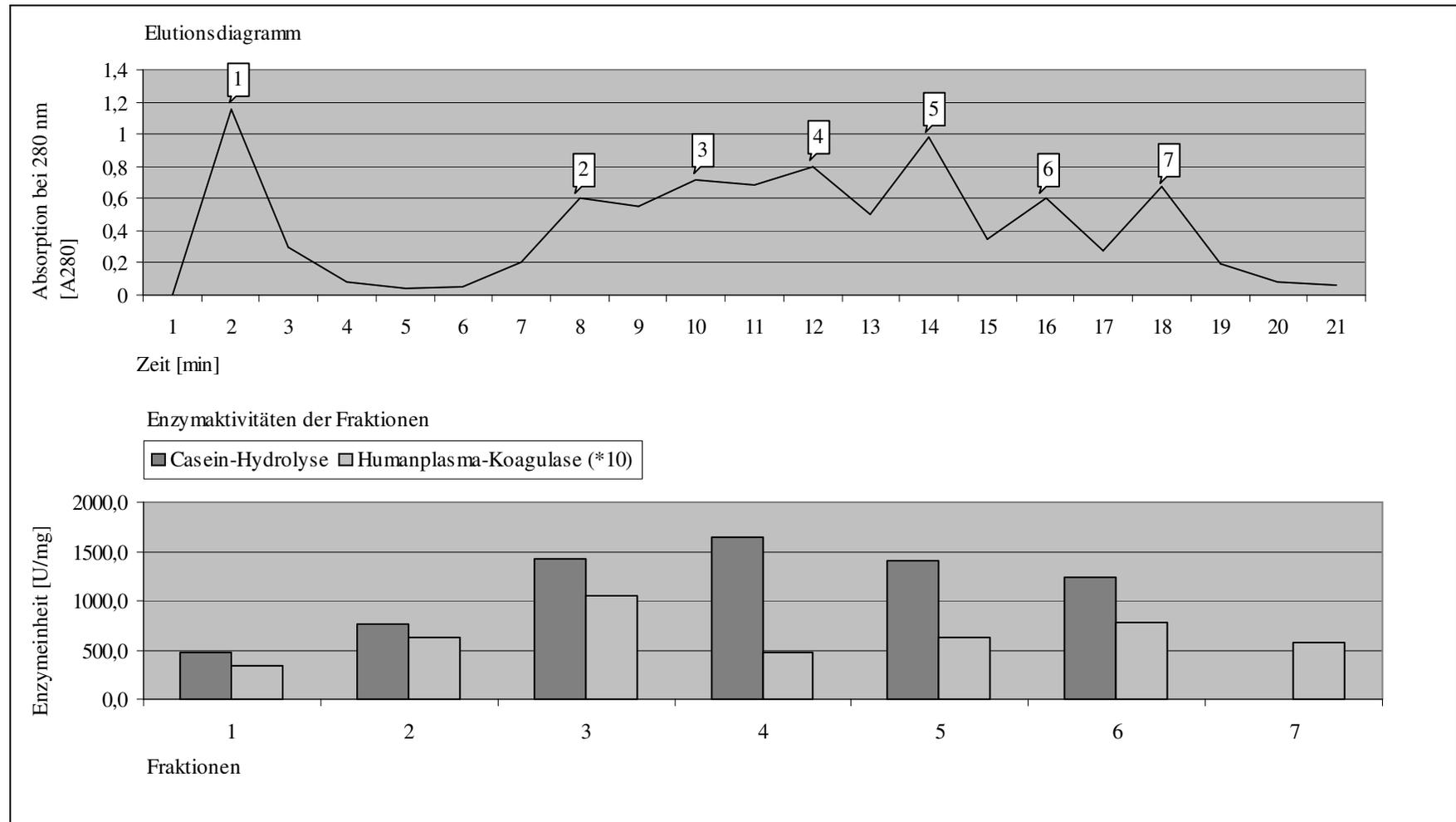
**Abbildung 16: Gift B10: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



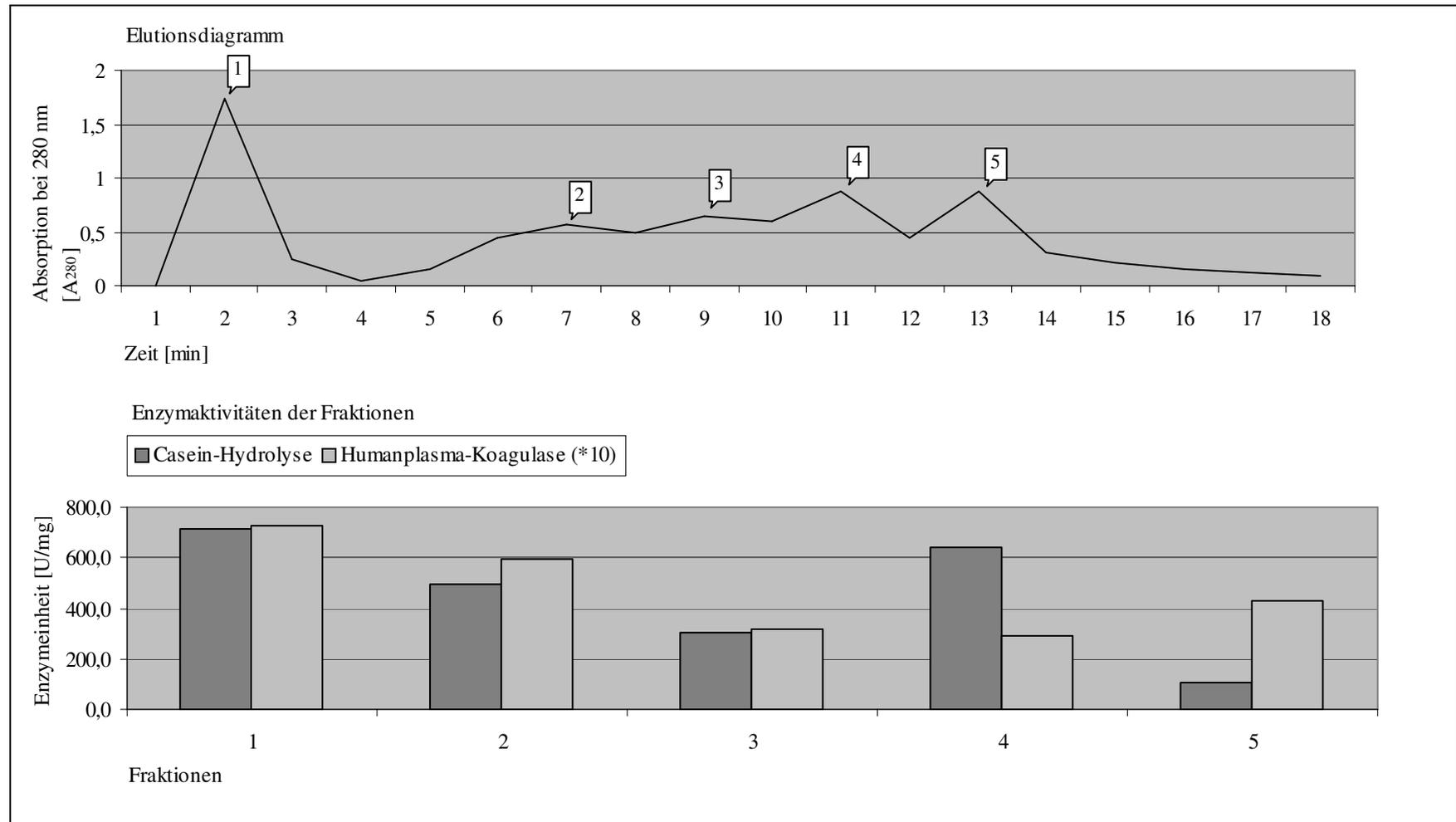
**Abbildung 17: Gift B11: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



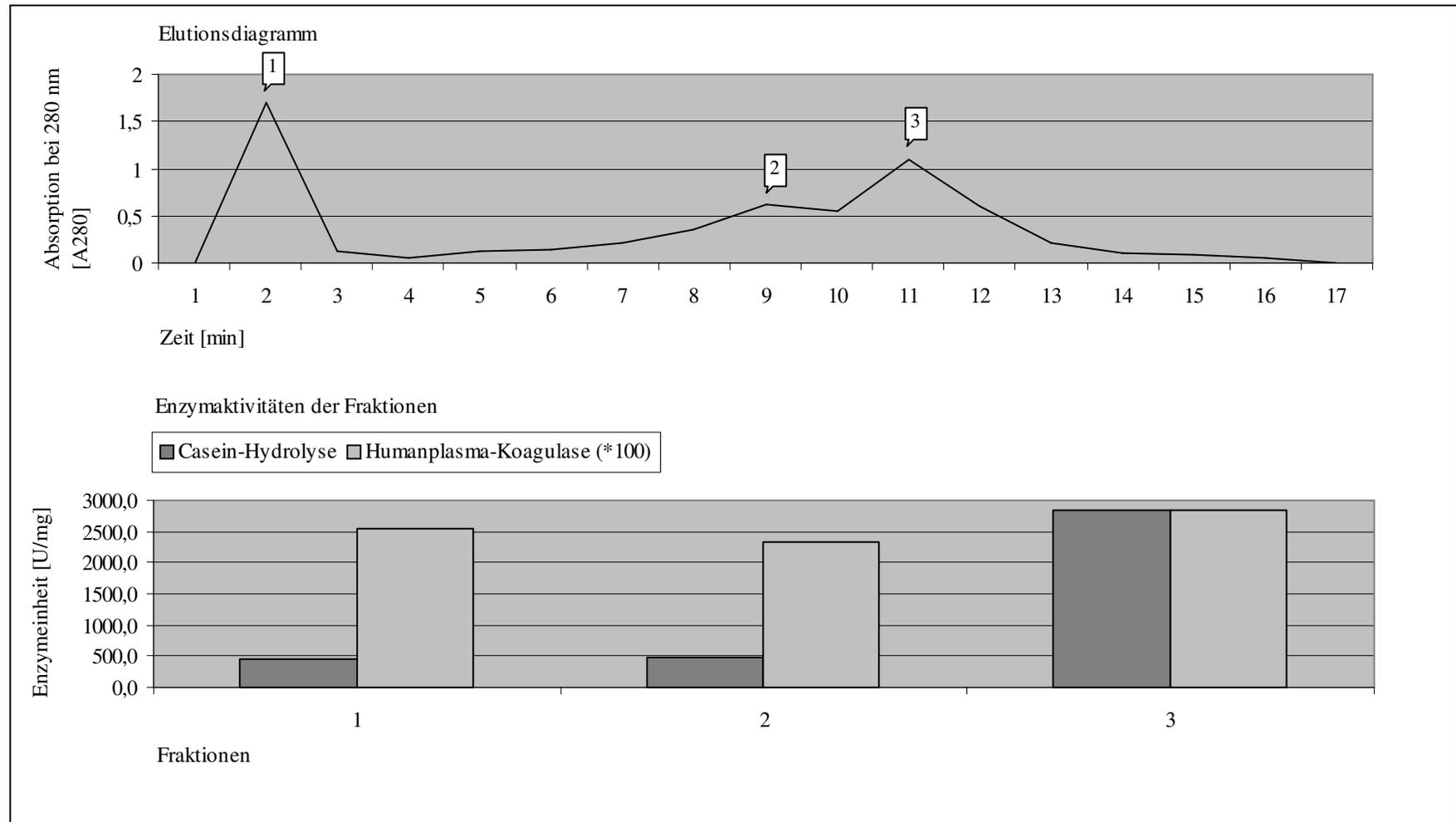
**Abbildung 18: Gift B12: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



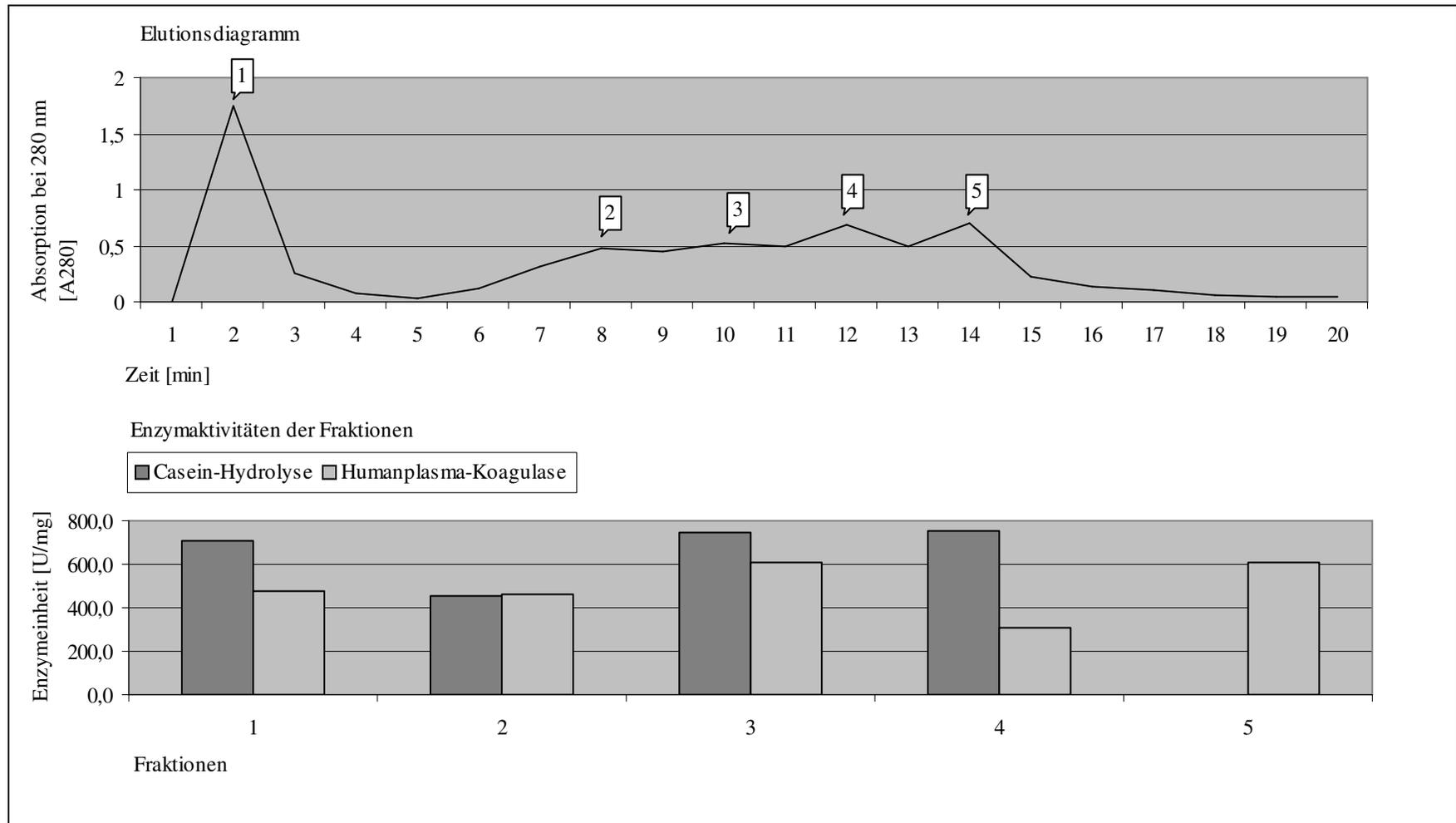
**Abbildung 19: Gift B13: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



**Abbildung 20: Gift B14: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



**Abbildung 21: Gift B15: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**



**Abbildung 22: Gift B16: Elutionsdiagramm und Enzymaktivitäten**

Gift	Enzymbestimmung	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 5	Fraktion 6	Fraktion 7
B0 1	Casein	169,7	927,5	489,5	804,4	1276,9	0,0	
	Humanplasma	101,9	63,4	77,3	63,8	61,4	42,3	
B0 3	Casein	1065,2	990,5	2028,6	1327,4	0,0		
	Humanplasma	37,6	41,3	32,2	48,2	56,1		
B0 5	Casein	0,0	182,0	160,9	545,8	0,0	1603,4	0,0
	Humanplasma	75,6	65,3	30,8	40,5	41,7	48,7	41,2
B0 6	Casein	75,3	706,4	3295,8				
	Humanplasma	32,8	48,8	77,3				
B0 7	Casein	172,8	585,2	774,2	436,2	0,0		
	Humanplasma	97,0	49,2	63,8	51,3	61,5		
B0 8	Casein	0,0	0,0	924,7	0,0			
	Humanplasma	28,6	14,7	30,2	20,6			
B0 9	Casein	522,6	559,9	1233,2	2429,2	173,5		
	Humanplasma	72,1	44,7	61,9	37,8	55,7		
B1 0	Casein	873,4	541,2	1330,0	1212,7	1218,9	2584,2	0,0
	Humanplasma	91,8	59,6	30,3	48,8	48,3	55,3	62,3
B1 1	Casein	0,0	0,0	0,0	1445,2			
	Humanplasma	24,2	32,6	10,6	34,2			
B1 2	Casein	921,5	161,2	296,4	558,5	433,3	1592,1	752,4
	Humanplasma	75,8	47,5	22,3	21,5	24,5	43,4	47,2
B1 3	Casein	478,2	756,9	1417,1	1650,9	1411,8	1244,2	0,0
	Humanplasma	33,3	62,0	105,9	47,7	62,7	78,1	57,9
B1 4	Casein	712,8	493,0	301,3	643,5	107,5		
	Humanplasma	73,0	59,3	31,6	29,3	43,0		
B1 5	Casein	455,2	469,3	2832,5				
	Humanplasma	25,4	23,3	28,4				
B1 6	Casein	709,9	452,2	748,1	753,6	0,0		
	Humanplasma	47,3	46,5	60,9	30,8	60,8		

**Tabelle 7: Enzymaktivitäten der Fraktionen von *Bothrops asper***

Gift	Enzymbestimmung	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 5	Fraktion 6	Fraktion 7
B01	Casein	+	+	+	+	++	-	
	Humanplasma	+++	++	+++	++	++	+	
B03	Casein	+	+	++	++	-		
	Humanplasma	+	+	+	++	++		
B05	Casein	-	+	+	+	-	++	-
	Humanplasma	+++	++	+	+	+	++	+
B06	Casein	+	+	+++				
	Humanplasma	+	++	+++				
B07	Casein	+	+	+	+	-		
	Humanplasma	+++	++	++	++	++		
B08	Casein	-	-	+	-			
	Humanplasma	+	+	+	+			
B09	Casein	+	+	++	+++	+		
	Humanplasma	++	++	++	+	++		
B10	Casein	+	+	++	++	++	+++	-
	Humanplasma	+++	++	+	++	++	++	++
B11	Casein	-	-	-	++			
	Humanplasma	+	+	+	+			
B12	Casein	+	+	+	+	+	++	+
	Humanplasma	+++	++	+	+	+	++	++
B13	Casein	+	+	++	++	++	++	-
	Humanplasma	+	++	+++	++	++	+++	++
B14	Casein	+	+	+	+	+		
	Humanplasma	++	++	+	+	++		
B15	Casein	+	+	+++				
	Humanplasma	+	+	+				
B16	Casein	+	+	+	+	-		
	Humanplasma	++	++	++	+	++		

**Tabelle 8: Semiquantitativer Überblick über die Enzymaktivitäten der Fraktionen von *Bothrops asper***

Gift	Anzahl der Fraktionen	Casein-Hydrolyse: Maximalwert [U/mg]	Maximum in Fraktion	Humanplasma-Koagulase: Maximalwert [U/mg]	Maximum in Fraktion
B01	6	1276,9	5	101,9	1
B03	5	2028,6	3	56,1	5
B05	7	1603,4	6	75,6	1
B06	3	3295,8	3	77,3	3
B07	5	774,2	3	97,0	1
B08	4	924,7	3	30,2	3
B09	5	2429,2	4	72,1	1
B10	7	2584,2	6	91,8	1
B11	4	1445,2	4	34,2	4
B12	7	1592,1	6	75,8	1
B13	7	1650,9	4	105,9	3
B14	5	712,8	1	73,0	1
B15	3	2832,5	3	28,4	3
B16	5	753,6	4	60,9	3

**Tabelle 9: Überblick über die Maximalwerte der Enzymaktivitäten der Fraktionen von *Bothrops asper***

Gift	Casein-Hydrolyse: Minimalwert [U/mg]	Minimum in Fraktion	Humanplasma-Koagulase: Minimalwert [U/mg]	Minimum in Fraktion
B01	0,0	6	42,3	6
B03	0,0	5	32,2	3
B05	0,0	1; 5; 7	30,8	3
B06	75,3	1	32,8	1
B07	0,0	5	49,2	2
B08	0,0	1; 2; 4	14,7	2
B09	173,5	5	37,8	4
B10	0,0	7	30,3	3
B11	0,0	1; 2; 3	10,6	3
B12	161,2	2	21,5	4
B13	0,0	7	33,3	1
B14	107,5	5	29,3	4
B15	455,2	1	23,3	2
B16	0,0	5	30,8	4

**Tabelle 10: Überblick über die Minimalwerte der Enzymaktivitäten der Fraktionen von *Bothrops asper***

## 4 Diskussion

Schlangengifte sind sehr heterogene Naturprodukte, die Enzyme und Toxine in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten. Die Zusammensetzung der Gifte variiert nicht nur von Art zu Art, sondern auch von Schlange zu Schlange, abhängig von den Lebensumständen des Tieres oder der Art der Gewinnung wie Aufbewahrung des Sekretes. Dieses Phänomen sollte anhand vergleichender enzymatischer Untersuchungen von insgesamt 36 verschiedenen Giftproben der Vipernarten *Crotalus atrox* (amerikanische Klapperschlange) und *Bothrops asper* (südamerikanische Lanzenotter) genauer analysiert werden.

Alle Klapperschlangen (*Crotalus atrox*), deren Gift untersucht wurde, stammten aus einem kleinen, eng umschriebenen Gebiet in Arizona, USA. Die Lanzenottern (*Bothrops asper*) waren in Ecuador gesammelt worden. Das Gift der Tiere wurde unter analogen Bedingungen gewonnen, getrocknet und aufbewahrt. Die Giftschlangen unterschieden sich hinsichtlich ihres Geschlechtes und ihrer Länge. Aussagen über das genaue Alter der durchweg adulten Tiere konnten nicht gemacht werden, da sie alle der freien Wildbahn entstammten. Trotz ähnlicher Lebensumstände der jeweiligen Schlangen-Art sowie des standardisierten Umgangs mit dem Gift waren die Enzymaktivitäten der Schlangengifte bei den acht durchgeführten Enzymbestimmungen auch innerhalb einer Art teilweise erheblichen Schwankungen unterworfen. Diese Heterogenität konnte nicht auf einzelne Faktoren zurückgeführt werden: Das heißt die Länge einer Giftschlange war beispielsweise nicht proportional zur Enzymaktivität ihres Giftes. Auch gab das Geschlecht eines Tieres keinen Hinweis auf die Aktivität eines bestimmten Enzyms im Schlangengift. Dies bestätigt Untersuchungen von Glenn und Straight [1977], die keinen Zusammenhang zwischen dem Protein-Gehalt, der Toxizität von Schlangengift und dem Geschlecht des Tieres nachweisen konnten.

Die Aktivität eines Schlangengiftes scheint von einer Vielzahl von Faktoren abhängig zu sein, die in ihrer Gesamtheit die Konzentration des Sekretes prägen. Dies entspricht den Ergebnissen zahlreicher Arbeiten [Glyod 1940; Goncalves und Vieira 1950; Minton 1953; Schenberg 1959; Master u. Kornalik 1965; Minton

1967; Johnson 1968; Fiero et al. 1972; Bonilla et al. 1973; Gubensek et al. 1974; Meier u. Freyvogel 1980; Sadahiro u. Omori-Satoh 1980; Mebs u. Kornalik 1984; Minton u. Weinstein 1986; Jayanthi u. Veerabasappa 1988; Soto et al. 1988]. Auch können bestimmte Inhaltsstoffe des Giftes selbst (zum Beispiel Inhibitoren) Auswirkungen auf die Enzymaktivitäten haben [Raudonat 1955; Ferreira u. Rocha e Silva 1965; Suzuki u. Iwanaga 1970].

Angesichts der heterogenen Gift-Zusammensetzung selbst innerhalb einer Spezies forderten manche Autoren, Gift-Eigenschaften für die taxonomische Einteilung von Schlangen heranzuziehen [Tu et al. 1965; Bertke et al. 1966; Jimenez-Porras 1967; Glenn u. Straight 1977; Chen et al. 1984; Aird 1985; Bernadsky et al. 1986].

Aussagen über absolute Werte hinsichtlich bestimmter Enzymaktivitäten von Schlangengiften können jedoch kaum gemacht werden. Es handelt sich vielmehr um Werte, die zu relativieren sind. Eine Standardisierung des Naturproduktes Schlangengift ist also schwierig.

Was die Peptidbindungen-spaltenden Enzyme anbetrifft, so war bei allen untersuchten Schlangengiften Argininester-Hydrolase-, Casein-Hydrolyse- sowie Hide-Powder-Azure-Aktivität nachweisbar. Die Gifte von *Crotalus atrox* wiesen insgesamt höhere Casein-Hydrolyse- und Hide-Powder-Azure-Aktivitäten als die Gifte von *Bothrops asper* auf.

Kocholaty et al. [1971] fanden, dass die Familie der Crotalidae im Vergleich zu den Elapidae und Viperidae nicht nur die enzymreichsten Gift-Sekrete produzierte, sondern dass diese auch die größte proteolytische Aktivität besaß. Die mitunter ausgedehnten Gewebsdefekte, die Crotalidae-Gifte verursachen können, sind wahrscheinlich teilweise auf ihren hohen Gehalt an proteolytischen Enzymen zurückzuführen [Ohsaka et al. 1960]. Andere Untersuchungen zeigten, dass die proteolytische Aktivität von Schlangengiften mit dem Alter der Tiere zunimmt [Lomonte et al. 1983; Minton u. Weinstein 1986; Mackessy 1988]. Aragón und Gubensek [1981] berichteten, dass Gifte von *Bothrops asper*, die an der

Pazifikküste Costa Ricas vorkommen, höhere proteolytische und weniger esterhydrolytische Aktivität aufwiesen als solche von der Atlantikküste. Aufgrund dieser Unterschiede könnte beziehungsweise sollte sogar taxonomisch zwischen den beiden Schlangenpopulationen differenziert werden, so die Autoren.

Alle Lanzenottern-Gifte besaßen sowohl Fibrinogen- als auch Humanplasma-Koagulase-Aktivität. Diese Gifte können also unabhängig von sonstigen plasmatischen Faktoren Fibrinopeptide von Fibrinogen abspalten und das entstandene Fibrin anschließend zu einem im Versuch sichtbaren Koagel vernetzen. Da *in vitro* auch Humanplasma dauerhaft koaguliert wird, scheinen keinerlei Inhibitoren im menschlichen Blut vorhanden zu sein, die diesen Prozess unterbinden könnten. *In vivo* komplizieren Thrombosen dagegen selten das Vergiftungsgeschehen nach einem Viperiden-Biss. Es kommt hingegen zur disseminierten intravasalen Gerinnung mit anschließender Verbrauchskoagulopathie, die zu einer Blutgerinnungsstörung mit hämorrhagischer Diathese führt.

Von den Klapperschlangen-Giften koagulierten vier Gifte (C01, C02, C15 und C18) Fibrinogen beziehungsweise fünf (C02, C03, C04, C08 und C17) mit jeweils sehr schwacher Aktivität Humanplasma. Die übrigen Gifte von *Crotalus atrox* erwiesen sich als inaktiv. Bei den Giften C03, C04, C08 und C17, die zwar Humanplasma koagulierten, nicht jedoch Fibrinogen, scheinen bestimmte plasmatische Faktoren notwendig zu sein, um eine Gerinnung zu bewirken. C02 hingegen vermag, ähnlich der Gifte von *Bothrops asper*, nicht nur Humanplasma, sondern auch reines Fibrinogen zu koagulieren. Bei den Schlangengiften C01, C15 und C18, die nur Fibrinogen, nicht aber Humanplasma koagulierten, könnten bestimmte plasmatische Faktoren aber auch die proteolytische Aktivität des Giftes selbst möglicherweise zur Wiederauflösung eines Koagels geführt haben. Die hier untersuchten Schlangengifte greifen somit auf unterschiedliche Art und Weise in die Blutgerinnung ein.

Stocker [1978] berichtete, dass *Bothrops asper*-Gifte viele spezifische Proteinasen mit koagulatorischen Eigenschaften enthalten, die mitunter sogar von Subspezies

zu Subspezies variieren. Andere Autoren zeigten, dass die Koagulase-Aktivität mit dem Alter der Schlange abnimmt [Bonilla et al. 1973; Kamiguti u. Hanada 1985; Gutierrez et al. 1990]. Bei der Untersuchung der Koagulase-Aktivität von Schlangen aus drei Generationen einer *Bothrops asper*-Familie waren die gleichen Variationen wie bei nichtverwandten Schlangen zu verzeichnen [Kornalik u. Taborska 1988].

In allen Giftproben war L-Aminosäureoxidase-Aktivität nachweisbar; wobei diese bei den Klapperschlangen-Giften höheren Schwankungen unterworfen war. Die Farbe der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten sogenannten „gelben“ Gifte wird durch Flavinadenindinukleotid (FAD), das Coenzym aller unspezifischen L-Aminosäureoxidasen, hervorgerufen. „Weiße“ Gifte enthalten demnach weder FAD noch L-Aminosäureoxidasen [Zeller u. Maritz 1944; Zwisler 1964; Kurth u. Aurich 1973]. Das Enzym L-Aminosäureoxidase kann Proteasen im Gift aktivieren [Zeller 1951] und trägt somit indirekt zur Toxizität desselben bei. Hohe L-Aminosäureoxidase-Aktivität korreliert aber nicht unmittelbar mit der Toxizität eines Schlangengiftes. Desweiteren zeigten Untersuchungen, dass das nur im Gift adulter Tiere vorkommt [Jimenez-Porras 1964; Fierro et al. 1972; Bonilla et al. 1973].

Die Gifte von *Bothrops asper* zeigten insgesamt höhere Phosphodiesterase-Aktivität als die Gifte von *Crotalus atrox*. Das Enzym Phosphodiesterase ist in der Biochemie von großer Bedeutung, da es sowohl Desoxy-, als auch Ribonukleinsäuren aufspaltet. So kann man mit der Hilfe von Phosphodiesterase aus Schlangengiften Nukleotidsequenzen studieren.

Während die Lanzenottern-Gifte durchschnittlich höhere Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität aufwiesen als die Gifte der Klapperschlangen, waren die Gifte C04, C07 und C20 von *C. atrox* völlig inaktiv. Ebenso wie Proteasen liegen Phospholipasen A<sub>2</sub> in Schlangengiften häufig als Isoenzyme vor, die Produkte von Genduplikationen sind und große strukturelle wie funktionelle Variabilität

aufweisen [Mebs 1999]. Es gibt allerdings keine Hinweise dafür, dass dies eine Anpassung an einen speziellen Beutetyp darstellt. In früheren Untersuchungen wurden Zusammenhänge zwischen Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität und dem Ausmaß an Myonekrose nach einem Schlangenbiss festgestellt [Mebs et al. 1983b]. Die hohen Werte für *Bothrops asper* korrelieren hier wahrscheinlich mit einer ausgeprägten myolytischen Aktivität des Schlangengiftes. Es gibt jedoch auch Phospholipasen A<sub>2</sub>, die keinerlei muskelzerstörende Potenz besitzen [Tu u. Passey 1971]. Andererseits enthalten Klapperschlangen-Gifte beispielsweise Myotoxin a, ein kleinmolekulares basisches Toxin, das keine Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität besitzt und trotzdem zu Myonekrose führt [Ownby et al. 1976]. So muss die im Vergleich zu den Lanzenottern-Giften niedrigere Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität der Klapperschlangen-Gifte nicht mit einer geringeren Gefahr der Myolyse im Vergiftungsgeschehen einhergehen. Ebenso sind die drei im Versuch völlig inaktiven Gifte nicht unbedingt frei von myonekrotischer Potenz. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität im Gift mit dem Alter der Schlange abnimmt [Mackessy 1988].

Die Gifte von *Bothrops asper* (mit Ausnahme von B02 und B04) wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie fraktioniert und anschließend die Enzyme Casein-Hydrolyse und Humanplasma-Koagulase in den einzelnen Fraktionen untersucht. Ziel dieser Versuche war es, die beiden Enzyme anzureichern; das heißt, es sollte möglichst nur noch in einer oder in nur wenigen Fraktionen eine bestimmte Enzymaktivität nachweisbar sein. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Enzyme mit Casein-Hydrolyse- und die mit Humanplasma-Koagulase-Aktivität in den gleichen Fraktionen vorhanden waren.

Schon Aird und Kaiser benutzten 1985 chromatographisch isolierte Fraktionen, um die Unterschiede in der Zusammensetzung von Schlangengiften studieren zu können. Mittels Anionenaustausch-Chromatographie konnten im Rahmen dieser Arbeit drei bis sieben Fraktionen aus den Giften der Art *B. asper* gewonnen werden, die jeweils die unterschiedlichsten Muster in ihren Enzymaktivitäten

zeigten. Diese Ergebnisse verdeutlichten noch einmal die enorme Variabilität in der Zusammensetzung der Gifte. Nur in den Giften B08 und B11 von *B. asper* konnte das Enzym mit Casein-Hydrolyse-Aktivität konzentriert in nur einer Fraktion nachgewiesen werden: Bei B08 wies ausschließlich Fraktion 3 und bei B11 Fraktion 4 Casein-Hydrolyse-Aktivität auf; alle übrigen Fraktionen waren inaktiv.

Ausnahmslos alle Fraktionen der Lanzenottern-Gifte besaßen Humanplasma-Koagulase-Aktivität. Dieses Enzym konnte also nicht separiert werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass zur Koagulation von Humanplasma mehrere Enzyme oder Faktoren im Gift benötigt werden. Zudem fiel auf, dass die beiden untersuchten Enzymaktivitäten relativ unabhängig voneinander auf die jeweiligen Fraktionen eines Schlangengiftes verteilt waren. Hohe proteolytische Aktivität in einer Fraktion ging also nicht immer mit hoher koagulatorischer Aktivität einher. Die Enzyme mit Casein-Hydrolyse-Aktivität scheinen also nicht oder nicht ausschließlich für die thrombinähnlichen Eigenschaften der Gifte verantwortlich zu sein. Es gibt sicherlich eine Vielzahl von Proteasen oder sonstiger Faktoren in den untersuchten Giften, die Fibrinogen spalten beziehungsweise in die Blutgerinnung eingreifen und Koagulase-Aktivität besitzen.

Der hier erneut bestätigten Heterogenität in der Zusammensetzung von Schlangengiften muss die Auswahl wie die Herstellung von Antiserum Rechnung tragen. Nicht jedes Tier vermag Antikörper gegen alle relevanten Antigene zu bilden [Barrio u. Brazil 1951; Bober et al. 1988]. Minton und Weinstein untersuchten 1985 Giftproben von *C. atrox* aus 13 verschiedenen Gebieten in den USA und zeigten, dass keines der beiden getesteten Antiseren (Wyeth Polyvalent Crotalid Antivenin und Mexican Suero Antiviperino) die Gifte vollständig neutralisierte. Das Gift von *C. atrox* ist eines von vier Giften, die zur Immunisierung von Pferden für die Herstellung von Antiserum benutzt werden. Zumindest einige der Inhaltsstoffe scheinen schwache Antigene zu sein, so dass keine Antikörper gebildet werden [Chippaux u. Goyffon M 1983].

Vor der Immunisierung eines Versuchstieres zur Gewinnung eines Antidots sollten die verwendeten Gifte auf ihren Gehalt an Enzymen untersucht werden. In der Praxis wird der Enzymgehalt von Schlangengiften, die zur Herstellung von Antiserum herangezogen werden, nur selten bestimmt. Häufiger wird das Versuchstier mit einer Mischung aus möglichst vielen in ihrer Zusammensetzung unbekanntem Giften immunisiert. Auf diese Art und Weise werden zwar Antikörper gegen eine Vielzahl von Antigenen gebildet, doch bleibt unklar, mit welchen Enzymen, Toxinen und sonstigen Giftbestandteilen das Immunsystem des Versuchstieres überhaupt in Kontakt gekommen ist und gegen welche Antigene keine Antikörper gebildet werden konnten. Außerdem werden auch Antikörper gegen für die Vergiftungssymptomatik völlig irrelevante Antigene gebildet. Ein ideales Antiserum sollte alle in einer bestimmten Region vorkommenden Schlangengifte neutralisieren können und zugleich so wenig sonstige Antigene wie möglich enthalten, um die Gefahr der Sensibilisierung des Patienten gegen Fremdproteine zu minimieren.

Gregory-Dwyer et al. [1986] forderten, Opfer von Schlangenbiss-Verletzungen individueller zu behandeln. Sie hatten monatlich Giftproben von 13 verschiedenen Klapperschlangen entnommen, untersucht und innerhalb einer Spezies sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede gefunden. Die Unterschiede in der Gift-Zusammensetzung bei Klapperschlangen sind mitunter so groß, dass sie durchaus Auswirkungen auf die Symptomatik einer Biss-Verletzung und die Wirksamkeit von Antiserum haben [Bober et al. 1988]. Antiserum, das beispielsweise mit Hilfe von Klapperschlangen-Gift aus dem Norden Brasiliens hergestellt wurde, ist wirkungslos bei einem Biss durch eine südbrasilianische Klapperschlange [Goncalves u. Veira 1950; Goncalves 1956].

Ärzte verlangen spezifischere Therapiemöglichkeiten, um die unterschiedlichsten Symptome, die Schlangenbisse verursachen, gezielter behandeln zu können [Hardy 1983; Jayanthi u. Veerabasappa 1988; Warrell et al. 1989]. So konnte die Koagulase-Aktivität von *Bothrops asper* spezifisch mit Antikörpern gegen thrombinähnliche Enzyme, die aus Antiserum isoliert worden waren, neutralisiert

werden [Claus u. Mebs 1989]. Ob es sinnvoll ist, für jede Vergiftungsart ein spezifisches Antidot zu entwickeln wird Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

## 5 Zusammenfassung

An 36 Schlangengiften der Vipernarten *Crotalus atrox* und *Bothrops asper* wurden jeweils acht Enzymbestimmungen durchgeführt: Argininester-Hydrolase, Casein- und Hide-Powder-Azure-Hydrolyse, Fibrinogen-Koagulase, Humanplasma-Koagulase, L-Aminosäureoxidase, Phosphodiesterase und Phospholipase A<sub>2</sub>. 14 Schlangengifte von *Bothrops asper* wurden zudem mittels Anionenaustausch-Chromatographie fraktioniert und die einzelnen Fraktionen auf ihre proteolytische Aktivität und die Fähigkeit, Humanplasma zu koagulieren, untersucht. Es zeigten sich trotz ähnlicher Lebensumstände der Tiere sowie des standardisierten Umgangs mit den Schlangengiften auch innerhalb einer Art erhebliche Variationen in den Enzymaktivitäten. Bei nur zwei Giften von *Bothrops asper* gelang es, das Enzym mit Casein-Hydrolyse-Aktivität in jeweils einer einzigen Fraktion anzureichern. Alle anderen fraktionierten Lanzenottern-Gifte wiesen diese Enzymaktivität gleich in mehreren oder allen Fraktionen auf. Humanplasma-Koagulase-Aktivität war ausnahmslos in jeder einzelnen Fraktion der untersuchten Gifte nachweisbar. Wahrscheinlich bewirkt ein komplexes Zusammenspiel gleich mehrerer Faktoren oder Enzyme im Gift die Blutgerinnung. Fraktionen mit hoher proteolytischer Aktivität für Casein zeigten nicht zwangsweise hohe prokoagulatorische Aktivität. Die Enzyme mit Casein-Hydrolyse-Aktivität scheinen also nicht für die thrombinähnlichen Eigenschaften der Gifte verantwortlich zu sein. Die hier erneut bestätigte Heterogenität in der Zusammensetzung von Schlangengiften führt zu folgendem Schluss: Vor der Immunisierung eines Versuchstieres zur Gewinnung eines Antiserums sollten die verwendeten Gifte auf ihre Enzym- sowie biologischen Aktivitäten untersucht werden.

## 6 Abstract

Crude venom samples from 36 specimens of the Viperidae *Bothrops asper* and *Crotalus atrox* were analyzed for eight different enzyme activities. Furthermore fractions of 14 venom samples of *Bothrops asper* were isolated by anion exchange chromatography and were tested for their proteolytic and coagulant activity. Despite similar habitat conditions of the snakes and standardized handling of the venom samples the enzymatic activities showed high variability. In two venom samples of *Bothrops asper* the enzyme with proteinase activity towards casein could be separated. The other venoms tested exhibited proteolytic activity in more than two fractions. The fact that procoagulant activity was found in all fractions suggests the possibility that several factors and enzymes produce coagulant effects. Not all fractions which had high proteolytic activity towards casein also exhibited high procoagulant activity. This indicates that enzymes with proteolytic activity towards casein are not identical with those which have thrombin-like effects. Fibrinolytic activity of snake venoms is therefore exerted by several enzymes and factors. Because of the variability in venom composition demonstrated in this study snake venoms used in immunization to produce antivenoms in experimental animals should be tested for their biological activities, including their enzymatic activities.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aird S (1985): A quantitative assessment of variation in venom constituents within and between three nominal rattlesnake subspecies. *Toxicon*, 23: 1000 - 1004
- Aird SD, Kaiser II (1985): Comparative studies on three rattlesnake toxins. *Toxicon*, 23: 361 - 374
- Aragón F, Gubenšek F (1981): *Bothrops asper* venom from the atlantic and pacific zones of Costa Rica. *Toxicon*, 19: 797 - 805
- Barrio A, Brazil OV (1951): Neuromuscular action of the *Crotalus terrificus terrificus* poisons. *Acta Physiol Lat-Am*, 1: 291 - 308
- Bauchot R (1994): Schlangen. Naturbuch; Augsburg
- Bernadsky G, Bdolah A, Kochva E (1986): Gel permeation patterns of venoms from eleven species of the genus *Vipera*. *Toxicon*, 24: 721 - 725
- Bertke EM, Watt DD, Tu AT (1966): Electrophoretic patterns of venoms from species of Crotalidae and Elapidae snakes. *Toxicon*, 4: 73 - 76
- Bevan P, Hiestand P (1983):  $\beta$ -RTX: a receptor-active protein from Russell's viper (*Vipera russelli russelli*) venom. *J Biol Chem*, 258: 5319
- Bjarnason JB, Fox JW (1994): Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther*, 62: 325
- Bober MA, Glenn JL, Straight RC, Ownby RC (1988): Detection of myotoxin a-like proteins in various snake venoms. *Toxicon*, 26: 665 - 673
- Böhringer Mannheim (1973): *Biochemica Information*, I: 41 - 42
- Bonilla CA, Faith MR, Minton SA (1973): L-Amino acid oxidase, phosphodiesterase, totalprotein and other properties of juvenile timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom at different stages of growth. *Toxicon*, 11: 301 - 304
- Breithaupt H, Rübsamen K, Habermann E (1974): Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. *Eur J Biochem*, 49: 333
- Broad AJ, Sutherland SK, Lovering KE, Coulter AR (1980): Trypsin fails as Australian snake bite cure. *Med J Aust*, 2: 388

- Bucknall NC (1991): Electrical treatment of venomous bites and stings. *Toxicon*, 29: 397
- Cervenansky C, Dajas F, Harvey AL, Karlsson E (1991): Fasciculins, anticholinesterase toxins from mamba venoms: biochemistry and pharmacology. In: Harvey AL (Hrsg): *Snake Toxins*. Pergamon Press; Oxford; 303
- Chen PS, Wu X, Zhao E (1984): Classification of *Agkistrodon* species in China. *Toxicon*, 22: 53 - 61
- Chippaux JP, Goyffon M (1983): Producers of antivenomous sera. *Toxicon*, 21: 739
- Claus I, Mebs D (1989): Cross-neutralization of thrombin-like enzymes in snake venoms by polyvalent antivenoms. *Toxicon*, 27: 1397 - 1399
- Dart RC, Seifert SA, Boyer LV, Clark LV, Hall E, McKinney P, McNally J, Kitchens CS, Curry SC, Bogdan GM, Ward SB, Porter RS (2001): A randomized multicenter trial of crotalinae polyvalent immune Fab (ovine) antivenom for the treatment for crotalinae snakebite in the United States. *Arch Intern Med*, 161: 2030 - 2036
- Die Bibel, Lutherbibel Standardausgabe (1985). Biblia Druck; Stuttgart
- Dreyer F (1990): Peptide toxins and potassium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 115: 93
- Dufton MJ, Hider RC (1991): The structure and pharmacology of elapid cytotoxins. In: Harvey AL (Hrsg): *Snake Toxins*. Pergamon Press; Oxford; 259
- Duran-Reynals F (1939): Spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action. *J Exp Med*, 69: 69
- Elliott WB (1978): Chemistry and immunology of reptilian venoms. In: Gans C (Hrsg): *Biology of the Reptilia*, 8. Academic Press; London; 163 - 436
- Fan HW, Cardoso JL (1995): Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meier J, White J (Hrsg): *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press; Boca Raton; 667

- Ferreira SH, Rocha e Silva M (1965): Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia*, 21: 347 - 344
- Fiero MK, Seifert MW, Weaver JJ, Bonilla CA (1972): Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venoms. *Toxicon*, 10: 81 - 82
- Freyvogel TA, Meier J (1982): Giftschlangen und Schlangengifte. *Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol*, 4: 7 - 19
- Furukawa K, Ishimura S (1990): Use of thrombin-like snake venom enzymes in the treatment of vascular occlusive diseases. In: Stocker KF (Hrsg): *Medical use of snake venom proteins*. CRC Press; Boca Raton; 601
- Glass TG (1969): Cortisone and immediate fasciotomy in the treatment of severe rattlesnake bite. *Tex Med*, 65: 41
- Glenn JL, Straight RC (1977): The midget faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*), venom: lethal toxicity and individual variability. *Toxicon*, 15: 129 - 133
- Glyod HK (1940): The rattlesnake genera *Sistrurus* and *Crotalus*. *Chicago Acad Sci Spec Publ*, 4: 266 - 280
- Gomez HF, Dart RC (1995): Clinical toxicology of snakebite in North America. In: Meier J, White J (Hrsg): *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press; Boca Raton; 619
- Goncalves JM (1956): Estudos sobre venenos de serpentes Brasileiras, 2, *Crotalus terrificus crotominicus* subspecies biologica. *Ann Acad Bras Sci*, 28: 365 - 367
- Goncalves JM, Vieira LG (1950): Estudos sobre venenos de serpentes Brasileiras, 1, Analise Electrophoretica. *Anais Acad Brasil Cienc*, 22: 141
- Gopalakrishnakone P, Hawgood BJ, Theakston RDC (1981): Specificity of antibodies to the reconstituted crotoxin complex, from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and double immunodiffusion. *Toxicon*, 19: 131 - 139

- Gray S (2003): Pressure immobilization. *Wilderness Environ Med*, 14: 70 - 71
- Greene HW (1997): *Snakes, the Evolution of Mystery in Nature*. Univ Calif Press; Berkeley
- Gregory-Dwyer VM, Egen NB, Bianchi Bosisio A, Righetti PG, Russell FE (1986): An isoelectric focusing study of seasonal variation in rattlesnake venom proteins. *Toxicon*, 24: 995 - 1000
- Gubensek F, Sket D, Turk V, Lebez D (1974): Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation in its composition. *Toxicon*, 12: 167 - 171
- Guderian R, Mackenzie C, Williams J (1986): High voltage treatment for snakebites. *Lancet*, 2: 229
- Gutierrez JM (1995): Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: Meier J, White J (Hrsg): *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press; Boca Raton; 645
- Gutierrez JM, Avila C, Camacho Z, Lomonte B (1990): Ontogenic changes in venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (Bushmaster) from Costa Rica. *Toxicon*, 28: 419 - 426
- Hardy DL (1983): Envenomation by the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) in southern Arizona U.S.A. *Toxicon*, 21: 111 - 118
- Harvey AL (1993): Neuropharmacology of potassium ion channels. *Med Res Rev*, 13: 81
- Harvey AL, Anderson AJ, Marshall DL, Pemberton KE, Rowan EG (1990): Facilitatory neurotoxins and transmitter release. *J Toxicol Toxin Rev*, 9: 225
- Hawgood B, Bon C (1991): Snake venom presynaptic toxins. In: Tu AT (Hrsg): *Handbook of Natural Toxins*, 5: Reptile Venoms. Dekker, New York; 3
- Heard K, O'Malley GF, Dart RC (1999): Antivenom therapy in the Americas. *Drugs*, 58: 5 - 15
- Hendon RA, Bieber AL (1982): Presynaptic toxins from rattlesnake venoms. In: Anthony T (Hrsg): *Rattlesnake venoms, their action and treatment*. Dekker; New York; 211

- Hill RE, Bogdan GM, Dart RC (2001): Time to reconstitution: purified Fab antivenom vs. unpurified IgG antivenom. *Toxicon*, 39: 729 - 731
- Hsiung HL, Tsou TC, Hou YT, Liu TC, Chou HL, Li CY (1975): Experimental studies on curing elapid bite with trypsin. *Scientia Sinica*, 18: 396
- Huang HC, Lee CY (1980): Evaluation of trypsin treatment for snakebite envenomation. *Toxicon*, 18: 475
- Huang J, Zhou D, Tian L, Wu H, Zhang J, Zhang S, Chen H (2003): The effect of batroxobin on atherosclerosis. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 20: 197 - 201
- Hutton RA, Warrell DA (1993): Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood Rev*, 7: 176
- Iwanga S, Suzuki T (1979): Enzymes in snake venom. In: Lee CY (Hrsg): *Handbook of Experimental Pharmacology*, 52: Snake Venoms. Springer; Berlin; 61
- Jayanthi GP, Veerabasappa GT (1988): Geographical variation in India in the composition and lethal potency of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon*, 26: 257 - 264
- Jimenez-Porras (1964): Intraspecific variations in composition of venom of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. *Toxicon*, 2: 187 - 195
- Jimenez-Porras JM (1967): Differentiation between *Bothrops nummifera* and *Bothrops picadoi* by means of the biochemical properties of their venoms. In: Russell FE, Saunders PR (Hrsg): *Animal Toxins*. Pergamon Press; Oxford; 307 - 321
- Johnson BD (1968): Selected Crotalidae venom properties as a source of taxonomic criteria. *Toxicon*, 6: 5 - 10
- Kamiguti AS, Hanada S (1985): Study of the coagulant and proteolytic activities of new born *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 23: 580
- Kini RM (1997): *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Wiley & Sons; Chichester
- Klauber LM (1956): *Rattlesnakes. Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind*, 2. University of California Press; Berkeley

- Kocholaty WF, Ledford EB, Daly JG, Billings TA (1971): Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venoms of Crotalidae, Elapidae and Viperidae. *Toxicon*, 9: 131 - 138
- Kochva E (1987): The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*, 25: 65
- Kornalik F (1991): The influence of snake venom proteins on blood coagulation. In: Harvey AL (Hrsg): *Snake Toxins*. Pergamon Press; Oxford; 323
- Kornalik F, Taborska E (1988): Intraspecies variability in the composition of the coagulant active snake venoms. In: Pirkle H, Markland FS (Hrsg): *Haemostasis and Animal Venoms*, 7. Dekker; New York; 503 - 513
- Kunitz M (1947): Crystallin soybean trypsin inhibitor. *J Gen Physiol*, 30: 291
- Kurth J, Aurich H (1973): Reinigung und einige Eigenschaften der L-Aminosäureoxidase aus dem Gift der Sandotter. *Acta Biol Med Germ*, 31: 641 - 653
- Laravuso RB (1980): Cortical blindness in a child after anesthesia. *JAMA*, 243: 1187
- Lee CY (1979): Snake venoms. In: Lee CY (Hrsg): *Handbook of Experimental Pharmacology*, 52. Springer; Berlin
- Lomonte B, Gene JA, Gutierrez JM, Cerdas L (1983): Estudio comparativo de los venenos de serpiente Cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. *Toxicon*, 21: 379 - 384
- Mackessy SP (1988): Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *Copeia*, 1: 92 - 101
- Marinetti GV (1965): The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochem Biophys*, 98: 554
- Master RWP, Kornalik F (1965): Biochemical differences in yellow and white venoms of *Vipera ammodytes* and Russell's viper. *J Biol Chem*, 248: 139 - 141
- McCullough NC, Gennaro JF (1963): Evaluation of venomous snake bite in the southern United States from parallel clinical and laboratory investigations. Development of treatment. *J Fla Med Assoc*, 49: 959 - 967

- Mebs D (1968): Vergleichende Enzymuntersuchungen an Schlangengiften unter besonderer Berücksichtigung ihrer Casein-spaltenden Proteasen. Hoppe-Seyler's Z physiol Chem, 349: 1115 - 1125
- Mebs D (1970): A comparative study of enzyme activities in snake venoms. Int J Biochem, I: 335 - 342
- Mebs D (1974): Chemie und Wirkungsweise von Schlangengiften. Umschau, 74: 42
- Mebs D (1977): Bißverletzungen durch „ungiftige“ Schlangen. Dtsch Med Wochenschr, 77: 1429
- Mebs D (1977b): Ein Enzym wirkt als Schlangengift. Umschau, 7, Heft 5: 151 - 152
- Mebs D (1978): Pharmacology of reptilian venoms. In: Gans C (Hrsg): Biology of the Reptilia, 8. Academic Press; London; 437 - 560
- Mebs D (1983): Giftschlangenbisse: Symptomatik und Therapie. Die gelben Hefte, 23, 2: 45
- Mebs D (1987): Elektroschockbehandlung von Schlangenbissen? Dtsch Med Wochenschr, 112: 235 - 236
- Mebs D (1990): Venom components with other important biological activities. In: Shier T, Mebs D (Hrsg): Handbook of Toxinology. Dekker; New York; 761
- Mebs D (1999): Snake Venom Composition and Evolution of Viperidae. Darmstädter Beiträge zur Naturgeschichte, 8: 145 - 148
- Mebs D (2000): Gifttiere: ein Handbuch für Biologen, Toxikologen, Ärzte, Apotheker. 2. Aufl. Wiss Verl-Ges; Stuttgart
- Mebs D, Ehrenfeld M, Samejima Y (1983): Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum-creatine-kinase. Toxicon, 21: 393
- Mebs D, Kornalik F (1984): Interspecific variation in content of a basic toxin in eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) venom. Toxicon, 22: 831 - 833

- Meier J, Freyvogel TA (1980): Comparative studies on venoms of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*), carpet viper (*Echis carinatus*) and spitting cobra (*Naja nigricollis*) snakes at different ages. *Toxicon*, 18: 661 - 662
- Minton SA (1953): Variation in venom samples from copperheads (*Agkistrodon contortrix mokasen*) and timber rattlesnakes (*Crotalus horridus horridus*). *Copeia*, 4: 212 - 215
- Minton SA (1967): Observations on toxicity and antigenic make-up of venoms from juvenile snakes. In: Russell FE, Saunders PR (Hrsg): *Animal Toxins*. Pergamon Press; Oxford; 531 - 562
- Minton SA, Weinstein SA (1986): Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon*, 24: 71 - 80
- Mosquera A, Idrovo LA, Tafur A, Del Brutto OH (2003): Stroke following *Bothrops spp.* snakebite. *Neurology*, 60: 1577 - 1580
- Ohsaka A (1979): Hemorrhagic, necrotizing and edema - forming effects of snake venoms. In: Lee CY (Hrsg): *Handbook of Experimental Pharmacology*, 52. Springer; Berlin; 480
- Ohsaka A, Idezawa H, Kondo H, Uchida N (1960): Hemorrhagic activities of habu snake venom, and their relationship to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities. *Br J Exp Pathol*, 41: 478
- Ownby CL (1990): Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Shier T, Mebs D (Hrsg): *Handbook of Toxinology*. Dekker; New York; 601
- Ownby CL, Cameron D, Tu AT (1976): Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Am J Pathol*, 85: 149
- Parker HE, Grandison AGG (1977): *Snakes - a natural history*. Cornell Univ Press; Ithaca
- Perez JC, McKeller MR, Perez JC, Sanchez EE, Ramirez MS (2001): An internet database of crotaline venom found in the United States. *Toxicon*, 39: 621 - 32
- Phelps T (1989): *Poisonous snakes*. Blandford Press; London

- Picolo G, Chacur M, Gutierrez JM, Teixeira CF, Cury Y (2002): Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Braz J Med Biol Res*, 35: 1221 - 1228
- Ramsey HW, Gennaro JF (1959): An analysis of the toxicity and haemolytic properties of stored dessicated venoms of two Crotalidae. *Am J Trop Med Hyg*, 8: 552
- Raudonat HW (1955): Papierchromatographische Abtrennung eines Proteasen-Hemmstoffes aus Schlangengiften. *Naturwissenschaften*, 42: 559 - 560
- Raw I, Guidolin R, Higashi HG, Kelen EM (1991): Antivenins in Brasil: Preparation. In: Tu AT (Hrsg): *Handbook of Natural Toxins*, 5: Reptile Venoms and Toxins. Dekker; New York; 557
- Razzell WE, Khorana HG (1959): Studies on polypeptides III: Enzymic degradation. Substrate specificity and properties of snake venom phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 234: 2105 - 2113
- Reid HA (1972): Snake bite; Part 1. Clinical features. *Tropical Doctor*, 2: 155 - 158
- Reitz CJ, Goosen DJ, Odendaal MW, Visser L, Marais TJ (1984): Evaluation of the Venomex apparatus in the treatment of Egyptian cobra envenomation. A study in rabbits. *S Afr Med J*; 66: 135
- Rosenberg P (1990): Phospholipases. In: Shier T, Mebs D (Hrsg): *Handbook of Toxinology*. Dekker; New York; 67
- Rothschild AM, Rothschild Z (1979): Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: Lee CY (Hrsg): *Handbook of Experimental Pharmacology*, 52: Snake Venoms. Springer; Berlin; 591 - 628
- Russell FE (1967): Pharmacology of animal venoms. *Clin Pharmacol Ther*, 8: 849
- Russell FE (1980a): Snake venom poisoning in the United States. *Annu Rev Med*, 31: 247
- Russell FE (1980b): Snake venom poisoning. Lippincott; Philadelphia

- Russell FE, Emery JA, Long TE (1960): Some properties of rattlesnake venom following 26 years storage. *Proc Soc Exp Bio Med*, 103: 737
- Sadahiro S, Omori-Satoh T (1980): Lack of a hemorrhagic principle in habu snake venom, *Trimeresurus flavoviridis* from the Okinawa Islands. *Toxicon*, 18: 366 - 368
- Schachter M (1980): Kallikreins (kininogenases) - a group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacol Rev*, 31: 1
- Schenberg S (1959): Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. *Science*, 129: 1361 - 1362
- Schwert GW, Takenaka Y (1955): A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta*, 16: 570
- Sherman DG, Atkinson RP, Chippendale T, Levin KA, Ng K, Futrell N, Hsu CY, Levy DE (2000): Intravenous ancrod for treatment of acute ischemic stroke: the STAT study: a randomized controlled trial. Stroke treatment with ancrod trial. *JAMA*, 283: 2395 - 2403
- Soto JG, Perez JC, Minton SA (1988): Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snake venoms. *Toxicon*, 26: 875 - 882
- Stocker K (1978): Defibrinogenation with thrombin-like snake venom enzymes. In: Markwardt F (Hrsg): *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, 46. Springer; Berlin; 451
- Suzuki T, Iwanaga S (1970): Bradykinin, Kallidin und Kallikrein. In: Erdös EG (Hrsg): *Handbook of Experimental Pharmacology*, 25: Snake Venoms. Springer; Berlin; 193 - 212
- Swaroop S, Grab B (1954): Snake bite mortality in the world. *Bull WHO*, 10: 35
- Tu AT (1982): *Rattlesnake venoms, their actions and treatment*. Dekker; New York
- Tu AT, James GP, Chua A (1965): Some biochemical evidence in support of the classification of venomous snakes. *Toxicon*, 3: 5 - 8
- Tu AT, Passey RB (1971): Phospholipase A from sea snake venom and its biological properties. In: Vries A de, Kochva E (Hrsg): *Toxins of Animal and Plant Origin*, I. Grodon and Breach; London; 419 - 436

- Underwood G (1979): Classification and distribution of venomous snakes in the world. In: Lee CY (Hrsg): Handbook of Experimental Pharmacology, 52: Snake Venoms. Springer; Berlin; 15
- Wingert W, Chan L (1988): Rattlesnake bites in Southern California and rationale for recommended treatment. West J Med, 148: 37
- Winkel KD, Hawdon GM, Levick N (1999): Pressure immobilization for neurotoxic snake bites. Ann Emerg Med, 34: 294 - 295
- World Health Organization (1981): Progress in the characterization of venoms and standardisation of antivenoms. WHO Offset Publ, 58:1
- Zeller EA (1951): Enzymes as essential components of toxins. In: Summer JB, Myrback K (Hrsg): Enzymes, 1. Academic Press; New York; 986 - 1013
- Zeller EA (1966): Enzymes of snake venoms as tools in biochemical research. Mems Inst Butantan, 33: 349 - 357
- Zeller EA, Maritz A (1944): Über eine neue L-Aminosäure Oxidase. Helv Chim Acta, 27: 1888 - 1902
- Zwisler O (1964): Zum Nachweis der L-Aminosäureoxidase in Schlangengiften. Behringwerke-Mitteilungen, 43: 293 - 306

## **Danksagung**

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Mebs bedanken. Er hat mir diese Arbeit anvertraut und mich in meinem Unterfangen exzellent betreut. Forschung und Lehre mit Vorbildcharakter.

Vor allem während des experimentellen Teils der Arbeit stand mir Diplom-Biologe Ulrich Kuch, wenn gerufen, mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Zentrums der Rechtsmedizin gilt ein aufrichtiges Dankeschön für die bereitwillige Aufnahme im Hause.

Ich habe den größten Teil meines Medizinstudiums an der Uniklinik Frankfurt absolviert. Entgegen aller Befürchtungen habe ich mich hier sehr wohl gefühlt und eine gute Ausbildung genossen. Sechs Jahre Frankfurt, sechs Jahre Medizinstudium. Vielen Dank an die City, vielen Dank an die Klinik!

Ich danke meiner Familie. Mitgegangen; mitgefangen. Vom Physikum bis zum Dr. med. stets mit im Boot und für den Erfolg der Projekte unerlässlich.

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name Katrin Langhammer  
Geburtsdaten 04.08.1977 in Grünstadt/Pfalz

### Schulbildung

08/1983 - 07/1987 Pestalozzi-Grundschule in Eisenberg/Pfalz  
08/1987 - 06/1996 Gymnasium Weierhof am Donnersberg/Pfalz

### Studium

Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt/M.:  
WS 1996 - SS 1997 Theater-, Film- und Medienwissenschaften  
WS 1997 Chemie  
SS 1998 - SS 2004 Humanmedizin  
Universität Claude Bernard Lyon 1:  
WS 2001 und SS 2002 Auslandsstudium mit ERASMUS

05.04.2000 Ärztliche Vorprüfung  
22.03.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11.04.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
25.05.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

28.04.2003 - 28.03.2004 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Frankfurt

### Praktika und Famulaturen

08/1997 und 10/1997 Krankenhaus Sachsenhausen Frankfurt:  
Krankenpflegedienst  
17.07.2000 - 18.09.2000 Markus-Krankenhaus Frankfurt:  
Famulatur: Plastische, Wiederherstellungs- und  
Handchirurgie  
16.07.2001 - 15.08.2001 Clementine-Kinderhospital Frankfurt:  
Famulatur: Pädiatrie  
01.08.2002 - 01.09.2002 Praxis Dr. Poizat Lyon:  
Famulatur: Radiologie

## Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Vergleichende enzymatische Untersuchungen an Schlangengiften von *Bothrops asper* und *Crotalus atrox*“

im

Zentrum der Rechtsmedizin der Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main

unter Betreuung und Anleitung von

Herrn Professor Dr. D. Mebs

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt, 30.08.2004