

## 13 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über den Versuch der Isolierung und Charakterisierung niedermolekularer Bestandteile aus dem Gift der Taiwan Kobra *Naja naja atra* berichtet. Es wurden vier Fraktionen mit einer schwach Bradykinin potenzierenden Wirkung und einem Molekulargewicht zwischen 6.700 und 6.900 gefunden.

Vor dem Hintergrund, daß aus einigen Schlangengiften, mit Ausnahme der Elapiden, Peptide isoliert und charakterisiert worden sind, die eine bestimmte pharmakologische Wirkung - nämlich die Potenzierung von Bradykinin und/oder die Hemmung der Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II - besitzen, wurde untersucht, ob in der ethanollöslichen Fraktion des Giftes der Taiwan Kobra *Naja naja atra* ähnliche Peptide vorhanden sind.

Eine Grundlage zu diesem Thema wird vorab in einem Überblick über die Chemie der Kobragifte unter besonderer Berücksichtigung der *Naja naja atra* und das Kallikrein-Kininsystem gegeben. Neben den biochemischen Eigenschaften wird auch die klinische Symptomatik kurz angerissen, um einen Einblick in die Struktur-Wirkungszusammenhänge zu geben. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, die einzelnen Giftkomponenten bestimmter Spezies zu unterscheiden, d. h., einen Überblick über die unterschiedliche Giftzusammensetzung innerhalb der Gattung zu geben. Dieses Anliegen konnte allerdings nur in gewissen Grenzen realisiert werden, da keine einheitliche Zuordnung zu den einzelnen Spezies besteht und die Gifte der Schlangen unterschiedlicher geographischer Herkunft große Differenzen in ihrer Zusammensetzung aufweisen.

Im experimentellen Teil sollten die niedermolekularen Anteile des Giftes der Taiwan Kobra auf das Vorliegen von Oligopeptiden getestet werden. Derartige Peptide mit Bradykinin potenzierender Wirkung sind bisher nicht aus Kobragiften isoliert worden.

Durch Einsatz verschiedener chromatographischer Methoden und eines screening Tests ist festgestellt worden, daß sich in dem Gift eine Fraktion (N7) mit einer schwach Bradykinin potenzierenden Wirkung befindet. Mit dieser Fraktion wurden verschiedene weitere biologische Tests durchgeführt. Ihre beiden Unterfraktionen N7.1 und N7.2 wiesen unterschiedliche biologische Wirkungen auf. N7.1 verstärkte geringgradig die durch Bradykinin ausgelöste Ileum-Kontraktion, relaxierte Duodenum, provozierte mittelgradige Ödeme, aber es verursachte

keine Hämorrhagien. Es war mittelgradig Gefäßpermeabilität steigernd, Kininase hemmend und geringgradig Blutdruck senkend. N7.2 war geringgradig Ileum-Kontraktion verstärkend, Duodenum relaxierend, nicht Ödem provozierend, nicht Gefäßpermeabilität steigernd, nicht Hämorrhagie auslösend und geringgradig Blutdruck senkend. Diese Fraktionen enthalten ferner noch eine (zyto-)toxische Komponente, da die Darmabschnitte nach Applikation von höheren Dosierungen eine anhaltende geringere Kontraktionsbereitschaft zeigten. Eine weitere Fraktion (N2) war Ileum-Kontraktion auslösend und Hämorrhagie fördernd. Diese hochmolekulare Fraktion enthält Toxine und Enzyme und wurde daher nicht näher untersucht. Da N7.1 und N7.2 Verunreinigungen enthielten, welche eine chemische Analyse unmöglich machten, wurde N7 erneut chromatographiert, diese Trennung ergab aufgrund einer leicht unterschiedlichen Methode 11 Fraktionen (N7F1 bis N7F11).

Zur Strukturaufklärung wurden Massenspektroskopie, Aminosäurenanalyse und -sequenzanalyse durchgeführt. Diese ergaben für die Fraktionen N7F8, N7F6, N9 und N11 ein Molekulargewicht von 6.740, 6.773, 6.901 bzw. 6.817, die Aminosäurezusammensetzung von N7F8 war gleich der von CT II. Die Sequenz von N9 entsprach zu je 50 % CT II und CT V, d. h., bei den isolierten, biologisch aktiven Substanzen handelt es sich um Kardiotoxine.

In keiner der Fraktionen konnte eine Substanz mit einem geringeren Molekulargewicht nachgewiesen werden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß sich im Gift der Taiwan Kobra keine Bradykinin potenzierenden Peptide befinden. Dies gilt möglicherweise für alle Kobras bzw. Elapiden, da bisher noch nie über die Isolierung Bradykinin potenzierender Peptide aus dem Gift der Elapidae berichtet wurde.

## 14 Summary

Sabine Schauch

Chemistry and biochemistry of the low molecular weight fraction toxins of the Taiwan cobra *Naja naja atra* venom

The present work gives an account of the isolation and characterisation of low molecular weight components of the venom of the Taiwan cobra *Naja naja atra*. Four fractions were found with a weak bradykinin potentiating activity and a molecular weight between 6,700 and 6,900.

On the basis of the fact that peptides from several snake venoms except the *elapidae* possess certain pharmacological and biochemical activities, for example the potentiation of bradykinin and/or the inhibition of the conversion of angiotensin I to angiotensin II, the author analysed the alcohol-soluble fraction of the venom of the cobra *Naja naja atra*.

The first part reviews the chemistry and biochemistry of snake venoms and gives a survey of the biology of snakes and the symptomatology of snakebite with stress on the elapids and *Naja naja atra*. A brief explanation of the kallikrein-kinin-system and bradykinin potentiating peptides (BPPs) follows to make structure activity relationships easier to understand.

The second, experimental part reports about the purification of the low molecular weight components of the alcohol-soluble fraction of the venom of *Naja naja atra*. Four fractions (N2, N7, N9, N11) with a weak bradykinin potentiating action were found by means of several chromatographic methods and a biological assay. N7 was the most active one. It was used to perform several biological assays at the laboratorio de bioquimica e biofisica, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. Its two subfractions N7.1 and N7.2 showed different biological activity:

N7.1 was potentiating the bradykinin action on guinea pig ileum, relaxing the rat duodenum, producing guinea pig paw oedema, increase of blood permeability, kininase inhibition and lowering arterial blood pressure.

N7.2 was potentiating the bradykinin action on guinea pig ileum, relaxing the rat duodenum and lowering its arterial blood pressure.

Both fractions contain a cytotoxic component that lowered the contractility of the gut after the application of higher doses.

Due to contamination of N7.1 and N7.2, rechromatography of N7 became necessary. Owing to slightly different conditions, N7 was separated into 11 fractions (N7F1 to N7F11). By means of mass-spectroscopy the molecular weight of N7F8, N7F6, N9 and N11 was determined to 6,740, 6,773, 6,901 and 6,817. Amino acid analysis and sequence analysis proved these fractions to be cardiotoxins. The aminoacid composition of N7F8 was similar to that of CT II. The sequence of N9 was 50% identically to CT II and 50% to CT V.

Since neither the above mentioned nor any of the other fractions contain important amounts of low molecular weight material, the crude venom of *Naja naja atra* seems to contain no low molecular weight BPPs. As no other report on the isolation of BPPs from elapid venom is existing, this result is in good agreement with other laboratories. Probably, the distribution of BPPs in snake venom is restricted to the families of *crotalidae* and *viperidae*.