

## 8 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Dissertation sollte es sein, biochemische Untersuchungen am Gift von *Heloderma suspectum* durchzuführen und dabei besonders die bisher unbehandelt gebliebenen niedermolekularen Substanzen zu berücksichtigen.

Zunächst sollte ein ausführlicher Literaturüberblick gegeben werden. Dabei wurde neben der Biologie der Krustenechsen auch auf die klinische Symptomatik der Echsenbißvergiftungen eingegangen und Therapievorschläge diskutiert. Darüberhinaus wurde über die bisherigen biologischen, biochemischen und chemischen Untersuchungen am Gift der Echsen berichtet. Nachdem die höhermolekularen Bestandteile schon vor längerer Zeit isoliert und charakterisiert worden waren, blieben niedermolekulare Substanzen weitestgehend unberücksichtigt. Die in den letzten zehn Jahren untersuchten Peptide lagen mit ihrer Molekülgröße noch in Größenordnungen über 4.000 m/e und wiesen über 30 AS auf. Kleinere Moleküle, deren Molekülgrößen im Bereich der BPP der Schlangengifte lagen, waren bis dato nicht isoliert worden.

Im experimentellen Teil wird über die eigenen biochemischen Untersuchungen berichtet:

Mit Hilfe des HPLC wurden die höhermolekularen Substanzen abgetrennt und die niedermolekularen isoliert. Dabei konnten zehn Peaks getrennt werden, von denen die ersten drei (Peak 1, 1a und 1b) als Pool der höhermolekularen Substanzen angesehen wurden und damit im Zuge weiterer Untersuchungen unberücksichtigt bleiben sollten. Die Peaks 2 bis 8 wurden dann der Massenspektrometrie unterzogen und für die Fraktionen 2 bis 4 gute Trennungen nachgewiesen. An diesen Fraktionen wurde auch eine AS-Sequenzanalyse versucht, doch waren die Peptide N-terminal gegen den Edman-Abbau blockiert. Die Fraktionen 5 bis 8 lagen nur in sehr geringen Quantitäten vor, so daß sie für weitere Tests nicht zur Verfügung standen.

In Anbetracht der Tatsache, daß in den Giften der Schlangen bereits seit langem Peptide bekannt sind, die die Wirkung von Bradykinin potenzieren, sollten auch die Peptide dieses Giftes hinsichtlich ihrer Bradykinin potenzierenden Effekte untersucht werden.

Die Durchführung biologischer Tests fand am Instituto Butantan in São Paulo, Brasilien, statt. Die biologische Aktivität hinsichtlich der Effektsteigerung von Bradykinin wurde am in Tyrode-Lösung getauchtem Meerschweinchenileum überprüft. Dabei zeigten alle getesteten Fraktionen (2 bis 4) Bradykinin potenzierende Wirkungen, der Effekt wurde bis zum 2,6-fachen verstärkt. Außerdem konnten den Fraktionen 2 und 3 Ödem provozierende Aktivitäten nachgewiesen werden. Allerdings verursachte bei den Versuchstieren keine der Fraktionen Haemorrhagien.

Es konnten also Fraktionen mit folgenden Eigenschaften getrennt werden:

- In Peak 2 wurde ein Peptid gefunden, dessen Molekulargewicht mit 1442 m/e veranschlagt wurde. Dieser Substanz wurde im Tierversuch neben Bradykinin potenzierender Wirkung am Meerschweinchendarm auch der Effekt der Ödembildung an Meerschweinchenpfoten nachgewiesen.
- Dem Peptid, das mit Peak 3 isoliert werden konnte, kann man eine Masse von 1453 m/e zuweisen. Gleich dem Peptid aus Peak 2 provoziert es Ödeme und verstärkt die Wirkung von Bradykinin auf glatte Muskulatur.
- Peak 4 enthält zwei Peptide, die mit Molekülgrößen von 1124 m/e und 1208 m/e eng beieinander lagen. Zwar potenzierte diese Fraktion den Effekt von Bradykinin, doch gelang damit keine Ödemprovokation.

Aus dem Gift der *Heloderma suspectum* konnten also Peptide isoliert werden, die sowohl in ihrer biologischen Aktivität zur Effektsteigerung von Bradykinin als auch in ihrer Molekülgröße mit den BPP vergleichbar sind.

## 9 SUMMARY

Constanze Grebe

### Biochemical assays on the venom of *Heloderma suspectum*

Aim of this thesis was to perform biochemical experiments on the venom of *Heloderma suspectum* studying especially the low molecular substances previously unobserved.

Firstly, a thorough survey on literature is given, in which the symptomatology of lizard's bite poisoning and suggestions for its therapy are discussed as well as the biology of the Gila monster. Furthermore the previous biological, biochemical and chemical assays on the lizards' venom are reported. After isolation and characterization of the high molecular components already some time ago, the lower molecular substances remained mostly unobserved. The peptides, analyzed in the past ten years were of molecular weights  $> 4.000$  m/e and consisted of more than 30 amino acids. Smaller molecules ranging in the size of bradykinin potentiating peptides of the snakes' venom had not been isolated so far.

The experimental part of this thesis reports the own biochemical experiments:

Using HPLC the higher molecular substances were separated and the lower molecular substances were isolated. During this process ten peaks could be separated, of which the first three (peak 1, 1a and 1b) were regarded as a pool of the higher molecular substances and, consequently, were to be left unobserved in the further investigation. Peaks 2 to 8 were analysed by means of mass spectroscopy and distinct separations of fractions 2 to 4 were proved. Amino acid sequence analysis was attempted with these fractions, but Edman-dismantling of the peptides was impossible due to N-terminal blocking. Fraction 5 to 8 existed only in very small quantities and, therefore, could not be used for further testings. Considering the fact that peptides which increase the effect of bradykinin have been known for a long time, also the peptides of this venom should be analyzed in regard of bradykinin potentiating effects.

Biological tests were performed at Instituto Butantan in São Paulo, Brazil. The biological activity regarding the potentiation of bradykinin effects was tested on the ileum of guinea-pigs, immersed in tyrode solution. During these experiments all tested fractions (2 to 4) showed bradykinin enhancing effects, the bradykinin effect was increased by up to 260 %. In addition to this edema provoking activities could be shown in fraction 2 and 3. None of the fractions, however, caused hemorrhage in tested animals.

Fractions with the following properties could consequently be isolated:

- In peak 2 a peptide was found, the molecular weight of which was calculated to be 1442 m/e. In addition to the bradykinin potentiating effect in guinea-pigs' ileum the effect of causing edema in guinea-pigs' paws could be shown.
- The peptide isolated in peak 3 has a molecular weight of 1453 m/e. Like the peptide in peak 2 it causes edema and increases the effect of bradykinin on smooth muscles.
- Peak 4 contains two peptides, close to each other in size, with molecular weights of 1124 m/e and 1208 m/e, respectively. This fraction did enhance the effect of bradykinin, yet it failed to cause edema.

Therefore, from the venom of *Heloderma suspectum* peptides could be isolated, which are comparable to the BPP concerning their biological activity in the enhancement of bradykinin effects as well as concerning their molecular weight.